

Aus der Klinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde  
der Universitätsmedizin Rostock

**Universität  
Rostock**



Traditio et Innovatio

# **Einsatz der konfokalen Endomikroskopie und der optischen Kohärenztomographie in der Diagnostik epithelialer Stimmrippendysplasien**

---

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

eingereicht am 26.09.2016  
öffentlich verteidigt am 19.07.2017  
von Benjamin von Stülpnagel  
geboren am 01.09.1984 in Berlin

**Dekan:** *Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, MBA*

**1.Gutachter:** **Prof.Dr. Tino Just, KMG Kliniken Güstrow**

**2.Gutachter:** **Prof.Dr. Cristoph Arens, HNO-Universitätsklinik Magdeburg**

**3.Gutachter:** **Prof.Dr. Christian Betz, HNO-Universitätsklinik München- Großhadern**

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	
<b>Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Anatomie des Larynx</b> .....	2
Aufbau der Stimmlippen.....	4
<b>1.2 Veränderungen des Epithels der Stimmlippen</b> .....	4
<b>1.3 Epidemiologie und Ätiologie des Larynx-Karzinoms</b> .....	8
<b>1.4 Diagnostik und Therapie epithelialer Veränderungen der Stimmlippen</b> .....	10
<b>1.5 Optische Kohärenztomographie (OCT)</b> .....	13
<b>1.6 Konfokale Mikroskopie</b> .....	16
<b>1.7 Problemstellung</b> .....	18
Diagnosestellung bei klinisch suspekten epithelialen Stimmlippenveränderungen.....	18
Evaluation zur Beurteilung klinisch verdächtiger Stimmlippenläsionen.....	19
<b>1.8 Zielsetzung</b> .....	20
<b>Material und Methoden</b> .....	21
<b>2.1 Einsatz von OCT und CEM</b> .....	21
Verwendete Messtechniken.....	21
Optische Kohärenztomographie.....	21
Konfokale Mikroskopie.....	23
Patienten und Datengewinnung.....	27
Datenauswertung.....	29
Optische Kohärenztomographie.....	29
Konfokale Mikroskopie.....	31
Statistik.....	32
<b>2.2 Verwendete Computersoftware</b> .....	35
<b>2.3 Klinische Pilotstudie zur Beurteilung unklarer Stimmlippenläsionen</b> .....	35
Statistische Auswertung.....	38
<b>Ergebnisse</b> .....	39
<b>3.1 Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen</b> .....	39
<b>3.2 Ergebnisse der Untersuchung mittels konfokaler Mikroskopie</b> .....	41
<b>3.3 Ergebnisse der Untersuchung mittels optischer Kohärenztomographie</b> .....	43
<b>3.4 Kombination der Untersuchungsmethoden</b> .....	45
<b>3.5 Patientenbeispiele</b> .....	46
Benigne Veränderungen.....	46
Geringe Dysplasie.....	48

Schwere Dysplasie.....	50
Carcinoma in situ.....	50
Mikroinvasives PEC.....	54
<b>3.6 Auswertung der Pilotstudie.....</b>	<b>58</b>
<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Vergleichende Untersuchung mittels CEM und OCT.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2 Vergleich mit aktuellen Arbeiten zur diagnostischen Wertigkeit von OCT und CEM.....</b>	<b>67</b>
Optische Kohärenztomographie.....	67
Konfokale Endomikroskopie.....	72
Kombinierter Einsatz von CEM und OCT.....	77
<b>4.3 Klinische Pilotstudie zur Beurteilung unklarer Stimmlippenläsionen.....</b>	<b>78</b>
<b>4.4 Ausblick.....</b>	<b>82</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>88</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>99</b>
Bildbeispiele zur Pilotstudie zur Beurteilung klinisch suspekter Stimmlippenläsionen.....	99
<b>Danksagung.....</b>	<b>101</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>102</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>104</b>
<b>Thesen.....</b>	<b>105</b>



## Abkürzungsverzeichnis

---

95%-KI	95%- Konfidenzintervall
Abb.	Abbildung
CE	Communauté Européenne
CEM	konfokale Endomikroskopie
Cis	Carcinoma in situ
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt
FN	falsch negativ
FP	falsch positiv
HNO	Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
HPV	humanes Papillomavirus
HRT	Heidelberg Retina-Tomograph
iOCT	intraoperative Optische Kohärenztomographie
lt.	laut
mm/ $\mu$ m	Millimeter/ Mikrometer
MIT	Massachusetts Institute of Technology
MRT	Magnetresonanztomographie
NPW	negativer prädiktiver Wert
OADT	oberer Aerodigestivtrakt
OCT	Optische Kohärenztomographie
PEC	Plattenepithelkarzinom

PPW	positiver prädiktiver Wert
PS-OCT	Polarisations-sensitive Optische Kohärenztomographie
RN	richtig negativ
RP	richtig positiv
FD-OCT	spectral-domain Optische Kohärenztomographie
SIL	Squamous Intraepithelial Lesion
SIN	Squamous Intraepithelial Neoplasia
Tab.	Tabelle
TD-OCT	time-domain Optische Kohärenztomographie
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil



## Einleitung

---

Karzinome des Larynx gehören mit einem Anteil von 1,5% bei Männern und unter 1% bei Frauen zu den weniger häufigen Tumorlokalisationen bei Krebsneuerkrankungen. [Robert Koch-Institut 2012]

Laut der Zahlen des Robert Koch-Instituts für den Zeitraum 2007/2008 wurden 30% (Männer) bzw. 24% (Frauen) der Neuerkrankungen im T1- Stadium diagnostiziert. [Robert Koch-Institut 2012] Eine frühe Diagnosestellung und eine zeitnahe Therapie zeigen einen großen Überlebensvorteil für die Patienten. [Kademani et al. 2005]

Bei Larynxkarzinomen handelt es sich zu über 90% um Plattenepithelkarzinome. Ihnen voraus gehen zumeist längere Zeit bestehende Veränderungen des Epithels, sogenannte Vorläuferläsionen, aus denen sich im Verlauf Plattenepithelkarzinome des Larynx entwickeln. [Forastiere et al. 2001] [Kleinsasser 1987]

Der Frühdiagnostik von Larynxkarzinomen und von epithelialen Dysplasien, die dem Plattenepithelkarzinom meist vorausgehen, kommt also eine entscheidende Bedeutung in der Verbesserung des Gesamtüberlebens zu. [Zhang et al. 2013] [Shaughnessy et al. 2002] Die Prognose von Patienten, die in einem Vorläufer- oder T1- Stadium behandelt werden konnten, ist deutlich besser, verglichen mit der von Patienten in fortgeschrittenen Stadien. [Habbous et al. 2014] [Kademani et al. 2005]

Zu den wichtigsten Aufgaben des Larynx zählen die Phonation und der Verschluss der Trachea beim Schluckvorgang. Die Sprache ist ein elementares soziales Element, deren Vorhandensein Einfluss auf die sozialen Teilhabemöglichkeiten eines Menschen in der Gesellschaft haben kann. Der Erhalt dieser Funktionen gehört zu den zentralen Sorgen der Patienten. [Metcalf et al. 2014]

Karzinome des Larynx, die erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden, erfordern nicht selten eine Kehlkopf(teil)resektion. Diese geht häufig mit einer Stimmverschlechterung bis hin zum Stimmverlust einher. [Theissing 2006] Eine frühere Diagnosestellung und Intervention kann also die Möglichkeit zur stimmerhaltenden Therapie erhöhen.

Die Diagnostik epithelialer Veränderungen der Stimmlippen beruht aktuell vor allem auf dem Ergebnis der Histopathologie. Verschiedene Ansätze in der Bewertung der Dysplasie-Kriterien (die in Tab. 2 zu sehen sind) und deren Zuordnung zu den Dysplasie-Graden sowie

interindividuelle Unterschiede zwischen den begutachtenden Pathologen [Lubsen und Olde Kalter 1992] können sich aber auch hier in unterschiedlichen Bewertungen gleicher Läsionen widerspiegeln, wie es Warnakulasuriya z.B. auch für die oralen epithelialen Dysplasien beschreibt. [Warnakulasuriya 2001] [Warnakulasuriya et al. 2008]

In der Frühdiagnostik suspekter Stimmlippenläsionen stehen verschiedene diagnostische Hilfsmittel zur Verfügung, wie sie z.B. Jerjes [Jerjes et al. 2011] in seinem Review beschreibt. Allerdings sind diese verschiedenen Techniken zumeist noch nicht im klinischen Alltag angekommen, sondern Gegenstand aktueller Studien und Untersuchungen.

Diese Verfahren ermöglichen im Gegensatz zur invasiven Diagnostik mittels Probenentnahme und histopathologischer Untersuchung eine optische Biopsie. Robert Alfano prägte diesen Begriff 1984 in seinen fluoreszenz-spektroskopischen Vergleichsuntersuchungen an gesundem und karzinomatösem Nieren- und Prostatagewebe von Ratten. [Alfano et al. 1984]

Die optische Kohärenztomographie und die konfokale Endomikroskopie als zwei dieser optischen Diagnoseverfahren wurden bereits mehrfach in Studien der HNO-Universitätsklinik Rostock verwendet und in ihren Einsatzmöglichkeiten untersucht. [Just et al. 2010] [Just et al. 2009a] [Just und Pau 2013] [Just et al. 2012a] [Just et al. 2011] [Farahati et al. 2009]

Erstmalig findet hier nun eine vergleichende in-vivo-Untersuchung an Patienten mit epithelialen Stimmlippenläsionen mittels beider Techniken statt.

Intention dieser Arbeit ist es nicht, einen neuen Goldstandard für die Diagnosefindung zu setzen, der die histopathologische Bewertung der Gewebe ersetzen soll. Vielmehr wird der Versuch unternommen, den Einsatz von zwei diagnostischen nicht-invasiven Verfahren bei unklaren epithelialen Läsionen der Stimmlippen zu untersuchen, die dem Kliniker, ob erfahren oder unerfahren, bei der Einschätzung makroskopisch suspekter Befunde eine Hilfestellung geben sollen. Hierbei sollen beide Techniken nicht nur konkurrierend, sondern auch im Zusammenspiel betrachtet werden.

## **1.1 Anatomie des Larynx**

Der Larynx bzw. Kehlkopf stellt den Übergang zwischen Pharynx und Trachea dar. Zu seinen

wichtigen Aufgaben zählt die Regulation der Atemfunktion als Verschluss der unteren Atemwege, die Phonation als Ort der Stimmbildung sowie seine Protektionsfunktion für die unteren Atemwege beim Schluckakt. In Ruhelage befindet sich der Oberrand etwa auf Höhe des Halswirbelkörpers 4, die Plicae vocales liegen einen Wirbelkörper tiefer. [Aumüller et al. 2010]

Aufgebaut ist das Kehlkopfskelett aus drei größeren Knorpeln, dem Cartilago epiglottica (Epiglottis, Kehldeckel), Cartilago thyroidea (Schildknorpel) und dem Cartilago cricoidea (Ringknorpel), sowie den paarigen Cartilagines arythenoideae (Stellknorpel). Es bildet zwei Gelenke, Articulatio cricothyroidea zwischen Ring- und Schildknorpel sowie Articulatio cricoarytenoidea zwischen Ring- und Stellknorpel, welche eine wichtige Funktion in der Phonation erfüllen. Zu den Kehlkopfmuskeln werden ein Außenmuskel und sieben Binnenmuskeln gezählt, die für die Bewegung des Ligamentum vocale bei der Stimmbildung und für den Schutz der Atemwege beim Schluckakt zuständig sind. Hinzu kommt noch die supra- und infrahyoidale Muskulatur, die mit ihrem Ursprung am Os hyoideum den Larynx als Ganzes bewegt. [Aumüller et al. 2010]

Der Larynx lässt sich in drei Etagen gliedern. Die oberste bildet das Vestibulum laryngis und misst die Strecke von Aditus laryngis bis zu den Plicae vestibulares. Klinisch spricht man vom supraglottischen Raum. In der Mitte findet sich der Ventriculus laryngis, klinisch transglottischer Raum. Er umfasst den Bereich zwischen Plicae vestibulares und Plicae vocales. Unterhalb spricht man vom subglottischen Raum, der Cavitas infraglottica, der sich bis zur Verbindung des Cartilago cricoidea mit der ersten Trachealspange erstreckt. [Aumüller et al. 2010]

Der Kehlkopf wird also durch zwei Schleimhautfalten in drei Ebenen geteilt, die kranialer gelegenen drüsenreichen Plicae vestibulares (Taschenfalten) und die caudal gelegenen Plicae vocales (Stimmfalten). Diese bilden die Rima glottidis (Stimmritze) als Spalt zwischen sich. Der glottisnahe Bereich der Stimmfalten wird auch als Ligamentum vocale (Stimmband) bezeichnet, subepithelial durchzogen wird sie vom Musculus vocalis. [Aumüller et al. 2010]

## **Aufbau der Stimmlippen**

Histologisch zeigt sich ein klar strukturierter Aufbau der Stimmlippenschleimhaut. Da die Stimmbänder einer hohen mechanischen Belastung ausgesetzt sind, werden sie von einem mehrschichtig unverhornten Plattenepithel bedeckt, welches beim Gesunden eine Dicke von 50-200 µm aufweist, bei dysplastischen Veränderungen aber stark zunehmen kann. [Arens et al. 2007] [Kraft et al. 2008] Abgeschlossen wird sie durch die aufgrund ihrer geringen Dicke von 0,5 bis 1 µm lichtmikroskopisch nicht erkennbaren Basalmembran. Subepithelial findet sich lockeres Bindegewebe in der Lamina propria, welche sich anhand ihrer Kollagenverteilung in drei Ebenen teilen lässt. [De Melo et al. 2003] Der obere Teil aus locker gepackten Elastinfasern und einem flexiblen Gerüst aus netzartig aufgebauten Kollagenfasern wird als Reinke-Raum bezeichnet. Benannt wurde dieser nach dem Rostocker Anatom Friedrich Berthold Reinke, der mit seinen Arbeiten [Reinke 1895] [Reinke 1897] viel zum Verständnis des Aufbaus der Stimmlippen beigetragen hat. In den beiden tieferen Schichten kommt es zu einer Abnahme der elastischen Bestandteile und zu einer stärkeren und dichteren Vernetzung der Kollagenfasern, die im unteren Teil auch eine direkte Verbindung zu Muskelfasern des Musculus vocalis aufweisen. Zusammengefasst werden diese beiden Schichten zum Ligamentum vocale, dem Stimmband.

Der histologisch fünfteilige Aufbau der Stimmlippen wird im sogenannten Body-Cover Modell [Fujimura 1981] als ein funktionell zweigeteiltes System beschrieben. Das Epithel und der Reinke-Raum stellen als superfizielle Schicht ein vergleichsweise locker gepacktes und verschiebliches Gewebe dar („Cover“). Das aus der intermediären und der tiefen Schicht der Lamina propria bestehende Ligamentum vocale stellt den Übergang zum Musculus vocalis dar („Body“), welche gemeinsam ein starres und nur wenig verschiebliches System bilden. [Denk et al. 1998] Diese Zweiteilung bedeutet auch eine unterschiedliche Beteiligung am Schwingungsablauf der Stimmlippen. [Hirano 1974]

## **1.2 Veränderungen des Epithels der Stimmlippen**

Die unten aufgeführten epithelialen Veränderungen der Stimmlippen können primär ohne spezifische Symptome bestehen. Gemein haben sie als mögliches Hauptsymptom eine durch sie bedingte Dysphonie als heiser und rau klingende Stimme. Je nach Ausprägung und Ort der

Läsion können sich auch eine Aphonie, eine eingeschränkte Belastbarkeit der Stimme, ein mögliches Fremdkörpergefühl, Reizhusten sowie durch Verlegung des Lumens eine eingeschränkte Atemfunktion ergeben. [Kleinsasser 1987]

Die verschiedenen Veränderungen des Epithels der Stimmlippe lassen sich in mehrere Gruppen einteilen. So finden sich entzündliche Vorgänge und ödematöse Schwellungen sowie benigne und maligne Tumoren. [Bühling et al. 2008] [Böcker et al. 2012]

Von den entzündlichen Erkrankungen, die mit einer Veränderung der Larynxschleimhaut einhergehen, ist primär die chronische Laryngitis zu nennen. Durch die länger bestehende und nicht ausgeheilte Entzündung der Larynxschleimhaut kommt es beim katarrhalischen Typ zur Bildung eines verrukösen Polyps, beim hyperplastischen Typ zu einer Verdickung des Epithels. Durch damit einhergehende dysplastische Veränderungen besteht ein Risiko zur Entartung. Zu den ödematösen Vorgängen zählt das Reinke-Ödem, eine Flüssigkeitsansammlung im Reinke- Raum, die uni- oder auch bilateral zu einer Verdickung der Stimmlippe führen kann. [Reinke 1897]

Bei den benignen Veränderungen sind die sogenannten Stimmlippenknötchen zu nennen, die als umschriebene, häufig gegenüberliegende Verdickung der Stimmlippen durch mechanische Überlastung oder fehlerhafte Stimmtechnik entstehen. Sie finden sich häufig am Übergang vom vorderen zum mittleren Drittel der Stimmlippen. Beim Stimmlippenpolyp handelt es sich um einen der Stimmlippe aufgelagerten benignen Tumor, der sich histologisch als entzündlich bedingte Hyperplasie der Schleimhaut präsentiert. Stimmlippengranulome sind knotige, aus Granulationsgewebe bestehende Pseudotumoren der Stimmlippen, welche ursächlich meist auf eine Stimmlippenverletzung zurückzuführen sind. Als Beispiel dient hier das Intubationsgranulom für ein iatrogen herbeigeführtes Granulom im Gegensatz zum Kontaktgranulom durch zu starke mechanische Beanspruchung. [Kleinsasser 1991]

Die analog der Terminologie der WHO Tumorklassifikation [Gale et al. 2005] als Vorläuferläsionen bzw. epithelial precursor lesions bezeichneten epithelialen Veränderungen sind potentiell maligne. Sie besitzen also ein erhöhtes Risiko für den Übergang in ein Plattenepithelkarzinom. [Gale et al. 2005]

Diese Vorläuferläsionen treten makroskopisch auf verschiedene Weisen in Erscheinung. So zeigen sich z.B. Leukoplakien durch Verhornungsstörungen, eine chronisch hyperplastische Laryngitis, umschriebene, z.T. auch verruköse Verdickungen, im Allgemeinen aber häufig



diffuse makroskopisch erkennbare Läsionen. [Kleinsasser 1987]

Vom äußeren Erscheinungsbild einer Läsion lässt sich jedoch meist keine verlässliche diagnostische Aussage zur Einteilung bzw. dem Schweregrad des Befunds treffen. Auch bei klinisch benigne imponierender Veränderung kann ein Carcinoma in situ oder ein mikroinvasives Karzinom vorliegen, wohingegen auch makroskopisch deutlich suspekte Befunde histopathologisch als einfache Hyperplasien erscheinen können. [Blackwell et al. 1995] [Kleinsasser 1987]

Definitionsgemäß [Gale et al. 2005] lassen sich bei den Vorläuferläsionen verschiedene Atypien in der Zellstruktur ausmachen. Diese sind nachfolgend in Tab. 1 dargestellt.

Tab.1: Histologische Dysplasie-Kriterien nach [Gale et al. 2005]

Störungen der Zellarchitektur	Zytologische Veränderungen
irreguläre Schichtung des Epithels	Anisonukleose (hohe Variabilität der Kerngröße)
Polaritätsverlust der Basalzellschicht	Anisozytosen (hohe Variabilität der Zellgröße)
tropfenförmige Reteleisten	Nukleäre Pleomorphismen
eine erhöhte Anzahl an Mitosen	Zelluläre Pleomorphismen
das Vorkommen superfizieller Mitosefiguren	eine erhöhte Kern-Plasma-Relation
Dyskeratosen	eine erhöhte Anzahl und Vergrößerung der Nucleoli
Anwesenheit von Keratin-Perlen	Vergrößerung des Nucleus
	atypische Mitosefiguren
	Hyperchromasie

Vorläuferläsionen und Präkanzerosen des Larynxkarzinoms wurden für diese Arbeit gemäß der WHO Tumorklassifikation [Gale et al. 2005] beurteilt und eingeteilt. Histologische Veränderungen der Epithelschicht lassen sich so in Hyperplasie, geringe, moderate und schwere Dysplasie sowie Carcinoma in situ unterteilen.

Diese Einteilung basiert auf einer Klassifikation von Vorläuferläsionen des Cervix-Epithels [Richart 1967], deren Übertragung auf den Oropharynx bzw. Larynx stets auch kontrovers diskutiert wurde. [Warnakulasuriya et al. 2008] Daher haben sich neben dieser WHO-Klassifikation zwei andere gängige Schemata zur Einteilung der Vorläuferläsionen etabliert.

Die Einteilung als intraepitheliale Neoplasien (Squamous Intraepithelial Neoplasia bzw. SIN) und die Ljubljana Klassifikation [Hellquist et al. 1999](Squamous Intraepithelial Lesions bzw. SIL) haben sich klinisch bewährt und finden parallel Anwendung. [Warnakulasuriya et al. 2008] [Eversole 2009] [Gale et al. 2005]

Tab.2: Vergleich der gebräuchlichen histologischen Klassifikationen der epithelialen Vorläuferläsionen modifiziert nach [Gale et al. 2005], [Gale und Zidar 2009], [Warnakulasuriya et al. 2008], [Michaels 1997] und [Sengiz et al. 2004]. Rechts in grau hinterlegt ist die in dieser Arbeit verwendete Einteilung der erhobenen Befunde in „low grade SIL“ und „high grade SIL“. Die histopathologische Auswertung am Institut für Pathologie der Universität Rostock erfolgte anhand der WHO-Kriterien, anschließend wurden die Befunde analog zu dieser Tabelle in die verwendeten Kategorien überführt.

WHO Klassifikation 2005	Squamous Intraepithelial Neoplasia „SIN“	Ljubljana Klassifikation Squamous Intraepithelial Lesions „SIL“	
Hyperplasie		<i>einfache Hyperplasie</i>	„low grade SIL“
geringe Dysplasie	<i>SIN I</i>	<i>basale/parabasale Hyperplasie</i>	
moderate Dysplasie	<i>SIN II</i>	<i>atypische Hyperplasie</i>	
schwere Dysplasie	<i>SIN III</i>		„high grade SIL“
Carcinoma in situ		<i>Carcinoma in situ</i>	
Plattenepithelkarzinom			SIL“

Eine Hyperplasie des Epithels wird beschrieben als eine Vermehrung der Zellzahl, welche sowohl in der spinozellulären Schicht (Akanthose) als auch in der Basalzellschicht (Basalzellhyperplasie) vorkommen kann. Zellatypien und Veränderungen in Architektur und Schichtung des Epithels finden sich hingegen nicht. [Gale et al. 2005] [Gale et al. 2009]

Von einer Dysplasie spricht man beim Auffinden von Zellatypien mit Architekturstörungen des Epithels. Da hier eine große Varianz an Ausprägung und Schwere der Zellveränderungen vorliegen kann, werden Dysplasien in drei Schweregrade unterteilt.

Bei der geringen Dysplasie des Plattenepithels der Stimmlippe beschränken sich die Störungen der Schichtung und Struktur der Zellen auf das basale Drittel des Epithels. [Gale et al. 2005]

Die moderate Dysplasie zeigt dagegen Architekturstörungen bis in das mittlere Drittel reichend. Als Grenzfall wird eine moderate Dysplasie je nach Ausprägung zytologischer Veränderungen von der geringen bzw. schweren Dysplasie abgegrenzt. Erreichen diese in

schwerer Ausprägung auch das obere Epitheldrittel, so ist dies als Anzeichen einer schweren Dysplasie anzusehen. [Warnakulasuriya et al. 2008]

Bei der schweren Dysplasie finden sich die Zellatypien und Störungen der typischen Zellschichtung auch über das mittlere Drittel hinausreichend. Die Diagnose eines Carcinoma in situ wird bei einer die gesamte Epitheldicke durchziehenden Störung der Schichtung sowie begleitend verstärktem Vorkommen von Zellatypien gestellt. Sowohl bei den verschiedenen Dysplasiegraden als auch beim Carcinoma in situ sind die Basalmembrangrenzen aber weiterhin intakt und es kommt zu keiner subepithelialen Infiltration. Das mikroinvasive Karzinom des Plattenepithels der Stimmlippe hingegen überschreitet per definitionem die Basalmembrangrenzen. [Warnakulasuriya et al. 2008] [Gale et al. 2005]

In Tab.2 sind die verschiedenen Klassifikationssysteme der WHO-Klassifikation gegenübergestellt. Die moderate Dysplasie stellt hierbei einen Grenzfall dar. Wie Gale und Zidar in ihrer Gegenüberstellung der Systeme ausführen, steigt die Progressionsrate zu einem Plattenepithelkarzinom von der geringen über die moderate zur schweren Dysplasie linear an. Die moderaten Dysplasien als atypische Hyperplasien gelten hierbei als Risikoepithel. [Gale und Zidar 2009] Die reine Zunahme der Epitheldicke zwischen geringer und moderater Dysplasie im Vergleich mit der moderaten zur schweren Dysplasie scheint hier jedoch signifikant geringer ausgeprägt. [Kraft et al. 2008b]

Mehana et al. definieren hingegen in ihrer interdisziplinären Konsensusarbeit zu Therapie und Diagnostik laryngealer Dysplasien die moderaten Dysplasien in Bezug auf das weitere Therapieregime bzw. den Abstand notwendiger Folgeuntersuchungen als „low-grade lesions“ im Kontrast zur schweren Dysplasie bzw. dem Carcinoma in situ. Die Zuordnung der moderaten Dysplasien ist demnach weiterhin ein kontrovers diskutiertes Thema.

### **1.3 Epidemiologie und Ätiologie des Larynx-Karzinoms**

Die aktuellen Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts [Robert Koch-Institut 2012] zeigen in Deutschland für das Jahr 2008 eine europastandardisierte Erkrankungsrate von 6,9 für Männer bzw. 0,9 für Frauen pro 100.000 Einwohnern. Das Lebenszeitrisko für ein Karzinom des Larynx liegt bei 1:150 bei Männern und 1:100.000 für Frauen. Diese Erkrankung betrifft also vorrangig männliche Patienten, das mittlere Erkrankungsalter ist hier mit 66 Jahren bzw. 64 Jahren bei den Frauen nahezu identisch.

Im Zeitverlauf zeigt sich verglichen mit den Zahlen der letzten Jahrzehnte eine Abnahme der Inzidenz bei den Männern (seit den 1980er Jahren um etwa 40%), während diese bei den Frauen seit dem Jahr 2000 nach vorherigem Anstieg fast gleich geblieben ist. Seit 1980 ist aber insgesamt eine Steigerung um fast 50% zu beobachten. [Robert Koch-Institut 2010]

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten sind mit 62% bzw. 60% für beide Geschlechter nahezu identisch und seit längerem konstant. Allerdings fällt diese stark ab, je höher das Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung ist. [Habbous et al. 2014]

Die rückläufige Neuerkrankungsrate bei nahezu konstanten Überlebensraten führt also bei den Männern zu einer stetig abnehmenden Prävalenz der Erkrankung, während bei den Frauen eine gegenläufige Tendenz zu beobachten ist. Diese findet allerdings auf einem weit niedrigeren Level statt. [Robert Koch-Institut 2010]

Tab.3: Epidemiologie des Larynxkarzinoms nach [Robert Koch-Institut 2012].  
Die Erkrankungs- und Sterberate sind europastandardisiert nach alter Europabevölkerung.

	2008	
	♂	♀
Neuerkrankungen absolut	3610	510
standardisierte Erkrankungsrate pro 100.000 Personen	6,9	0,9
mittleres Erkrankungsalter	66	64
standardisierte Sterberate pro 100.000 Personen	2,4	0,3
relative 5-Jahres-Überlebensrate	62%	60%

Die Ätiologie des Larynx-Karzinoms ist vielfach beschrieben. Fast ausschließlich handelt es sich um Plattenepithelkarzinome. [Kleinsasser 1987] Als größter Risikofaktor der Entwicklung eines bösartigen Tumors des Larynx gilt weiterhin das Rauchen, daneben der übermäßige Konsum von Alkohol. Verschiedene Studien wurden in der Vergangenheit hierzu veröffentlicht, die einen signifikanten Zusammenhang beschreiben. [Talamini et al. 2002]

[Hashibe et al. 2009] [Ramroth et al. 2004] [Maier et al. 1992] Interessant ist hierbei auch eine Arbeit aus dem Jahre 1974, die eine besonders geringe Inzidenz von Larynx-Karzinomen bei Mormonen festgestellt hat. Diesen ist aufgrund ihres Glaubens das Rauchen, aber auch der Genuss von Alkohol verboten. [Smart et al. 1974] Die risikosteigernde Wirkung von Rauchen und Alkohol zeigt dabei in einigen Studien [Talamini et al. 2002] [Hashibe et al. 2009] nicht nur eine additive Risikoerhöhung, vielmehr ergibt sich ein multiplikativer Effekt auf das Risiko eines Karzinoms des Larynx. Dieser Zusammenhang zeigt sich insbesondere für das Auftreten bei Männern, wohingegen bei Frauen insbesondere bei jungen Patienten diese Risikofaktoren nicht in vergleichbar hohem Maße beteiligt scheinen. [Hashibe et al. 2009]

Auch das humane Papillomavirus (HPV) gilt als Risikofaktor. Aktuelle Studien belegen ein erhöhtes Vorkommen von HPV-Infektionen in Tumoren des Kopf- und Halsbereichs und insbesondere auch des Larynx. [Masand et al. 2011] [Mehrad et al. 2013] Auch scheint es einen Zusammenhang zwischen Überleben und der Ätiologie des Tumors zu geben. Shaughnessy beschreibt ein besseres Gesamtüberleben und eine erhöhte Sensibilität für Radio- und Chemotherapie bei Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren des Kopf- und Halsbereichs. [Shaughnessy et al. 2014]

Ernährungsgewohnheiten besitzen ebenfalls Relevanz für die Entstehung von Larynx-Karzinomen. So erhöht der übermäßige Genuss von sehr scharfen Speisen das Risiko, während sich der Verzehr von bestimmtem Obst und Gemüse als protektiver Faktor erwiesen hat. [Freedman et al. 2008] [Kapil et al. 2005]

Ein Zusammenhang mit einer Exposition gegenüber Noxen wie Asbest, Nickel und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen ist ebenfalls bekannt. [Langevin et al. 2013] [Paget-Bailly et al. 2012] [Schneider 2012]

## **1.4 Diagnostik und Therapie epithelialer Veränderungen der Stimmlippen**

Die Diagnostik bei klinischem Verdacht auf eine Veränderung des Stimmlippenepithels umfasst nach Zimmermann eine Erhebung des kompletten HNO-Status inklusive Laryngoskopie und phoniatischer Diagnostik (Stroboskopie), eine Palpation und gegebenenfalls Sonographie des Halses, die bildgebende Diagnostik mit Röntgen-Thorax und gegebenenfalls CT/MRT je nach Stadium sowie eine Mikrolaryngoskopie mit Biopsie zur

histopathologischen Diagnostik und Panendoskopie zum Ausschluss eines Zweitkarzinoms. [Zimmermann et al. 2003]

Die Inspektion des Larynx steht hierbei im Zentrum der Diagnostik. Hier stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Der Beginn der indirekten Laryngoskopie mittels eines Spiegels wird auf den Gesangslehrer Manuel Garcia 1854 zurückgeführt. [Jahn und Blitzer 1996] Im heutigen klinischen Alltag werden starre Endoskope mit 70 bzw. 90° Optik zur Inspektion des Larynx verwendet. Bei starkem Würgereiz bietet sich die Nasopharyngolaryngoskopie als Alternative an. Hier wird ein flexibles Endoskop durch die Nase eingeführt, was die Inspektion des Larynx ermöglicht.

Im Rahmen der Laryngoskopie erlaubt die Stroboskopie eine Beurteilung der Beweglichkeit der Stimmbänder. Dies erfolgt durch Aufnahmen der verschiedenen Phonationsstellungen mittels schwingungssynchronen Blitzlichtes. [Oertel 1895] [Heymann 1933]

Die Blickdiagnostik erlaubt dem erfahrenen Kliniker, Rückschlüsse auf den vorliegenden Befund zu ziehen. Dennoch zeigt sich auch in der Auswertung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Fragebogens, dass eine sichere Aussage über Dignität und Ausbreitung einer Läsion hierdurch nicht möglich ist. Die Gefahr des Über- und Unterdiagnostizierens der Läsion scheint hier, unabhängig von der Erfahrung des Arztes, immer gegeben.

Die Probenentnahme und histopathologische Auswertung derselben stellt daher den Standard in der Diagnostik von unklaren Stimmlippenläsionen dar.

Bei dieser invasiven Maßnahme hat sich die Mikrolaryngoskopie nach Kleinsasser als Verfahren durchgesetzt. Im Rahmen dieses Eingriffs kann der Operateur die Läsion beim narkotisierten Patienten darstellen und in ihrer Ausdehnung, Oberfläche und makroskopischem Erscheinen untersuchen. Der Eingriff erlaubt eine Probenentnahme zur histopathologischen Untersuchung. Therapeutisch kann hier eine Exzisionsbiopsie oder eine Chordektomie durchgeführt werden, meist mittels Laserexzision. [Theissing 2006]

Die aktuell angewandten Therapien richten sich nach Ausmaß bzw. Ausdehnung und Histologie der epithelialen Läsion. Ziel der chirurgischen Therapien ist immer eine R0-Resektion der Läsion.

Die Radikalität der chirurgischen Therapie sollte unter Einbeziehung des obengenannten Body-Cover-Modells möglichst stimmerhaltend ausgeführt werden, jedoch nur unter Beachtung der Indikationsgrenzen für Teilresektionen. [Theissing 2006]

Stimm lippenveränderungen bis maximal Carcinoma in situ, die die Basalmembran also noch nicht durchbrochen haben, können komplett reseziert werden. Bei dieser Dekortikation oder subepithelialen Chordektomie wird das betroffene Stimmlippenepithel komplett entfernt. Dies kann kaltschneidend, aber auch mittels Laserchirurgie erfolgen. [Theissing 2006]

Bei infiltrierenden Tumoren, die die Stimmlippenbeweglichkeit nicht einschränken, findet die Tumorentfernung meist als subligamentäre oder erweiterte Chordektomie statt. Je nach Befall wird auf einer oder auf beiden Seiten das Epithel zusammen mit dem Ligamentum vocale entfernt, entweder mittels Mikroschere oder laserchirurgisch. Bei Befall des freien Rands der Stimmlippe kann diese auch nach Thyreotomie, d.h. nach temporärer Spaltung des Cartilago thyroidea erfolgen. [Theissing 2006]

Tumoren, die durch eine Chordektomie nicht komplett entfernt werden können, erfordern eine Larynxteilresektion. Je nach Ausdehnung des Tumors haben sich hier verschiedene chirurgische Techniken und Zugangswege etabliert. [Theissing 2006]

Radikal chirurgisch steht noch die Laryngektomie als Verfahren zur Verfügung, falls kein anderes Verfahren eine R0- Resektion erbringt bzw. benachbarte Strukturen betroffen sind (T4). [Theissing 2006]

Eine primäre Radiotherapie kann als Alternative zur Operation bei Carcinoma in situ bzw. T1-Tumoren in Betracht gezogen werden. [Theissing 2006]

Der Goldstandard in der Diagnostik suspekter Läsionen der Stimmlippen ist weiterhin die histopathologische Untersuchung des Gewebes.

Auch werden aktuell molekularbiologische Verfahren zur Diagnostik des entnommenen Gewebes anhand verschiedener Biomarker beschrieben. [Rodrigo et al. 2012] [Álvarez-Marcos et al. 2013] Diese Marker sind aber aktuell noch Gegenstand der Forschung, auch ist die Aussagefähigkeit ihres Vorliegens für die Entstehung von Stimmlippenkarzinomen noch nicht abschließend geklärt. [Warnakulasuriya 2001]

In neuerer Zeit wurden aber verschiedene diagnostische Verfahren entwickelt und angewandt, die dem Arzt eine Hilfestellung bei der Diagnosestellung und therapeutischen Verfahrenswahl geben sollen und die intraoperativ zum Einsatz kommen können.

Jerjes beschreibt in seinem Review über das Treffen der Head and Neck Optical Diagnostics Society in 2011 die dort vorgestellten optischen Verfahren, die eine nicht- bzw. minimalinvasive Diagnostik ermöglichen bzw. erleichtern sollen. [Jerjes et al. 2011] Dies

wären z.B. Elastic Scattering Spectroscopy, die über Lichtstreuungseffekte in Geweben eine Zuordnung zu dysplastischen Vorgängen ermöglicht [Jerjes et al. 2011], oder Raman Spectroscopy, welche vereinfacht ausgedrückt über einen Energiegewinn oder -verlust von monochromatischen Lichts eine diagnostische Aussage ermöglichen soll. [Bakker Schut et al. 2000] [Kallaway et al. 2013] Auch die in dieser Arbeit benutzen Techniken der konfokalen Endomikroskopie und der optischen Kohärenztomographie zählen zu den in diesem Review vorgestellten optischen Diagnoseverfahren.

## **1.5 Optische Kohärenztomographie (OCT)**

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist ein neueres diagnostisches Verfahren, das seit ihrer ersten Anwendung [Huang et al. 1991] bisher vor allem in der Ophthalmologie zum Einsatz kommt. Nachdem 1997 bei der in vivo-Untersuchung verschiedener Gewebe aus Ösophagus, Larynx, Harnblase, Magen und Uterus durch Sergeev et al. [Sergeev et al. 1997] mit einer an ein Endoskop gekoppelten OCT-Kamera Unterschiede im Schichtaufbau zwischen gesundem und malignem Gewebe ausgemacht werden konnten, erlangte dieser diagnostische Bereich in verschiedenen medizinischen Disziplinen verstärkte Aufmerksamkeit. Eine Kommerzialisierung der von Prof. James Fujimoto 1991 am Massachusetts Institute of Technology (MIT) entwickelten Technik erfolgte bislang vor allem im Bereich der Ophthalmologie, in anderen Bereichen wie der Dermatologie, Urologie, Neurochirurgie und Hals-Nasen-Ohrenheilkunde kommt sie vor allem im Rahmen von Studien zum Einsatz. [Cahill und Mortensen 2010] [Forsea et al. 2010]

Die OCT ist ein nicht-invasives diagnostisches Verfahren, welches dem Prinzip nach ähnlich dem Ultraschall funktioniert. Im Gegensatz hierzu wird aber Licht anstelle des Schalls zur Bildgebung verwendet. Dies ermöglicht mit Auflösungen von 1-10  $\mu\text{m}$  eine Steigerung um den Faktor 100 gegenüber hochauflösendem Ultraschall (Auflösung 10-700  $\mu\text{m}$ ), allerdings mit einer aktuell erreichbaren Eindringtiefe von maximal 4-5  $\mu\text{m}$  in Gewebe. [Wisweh 2010]



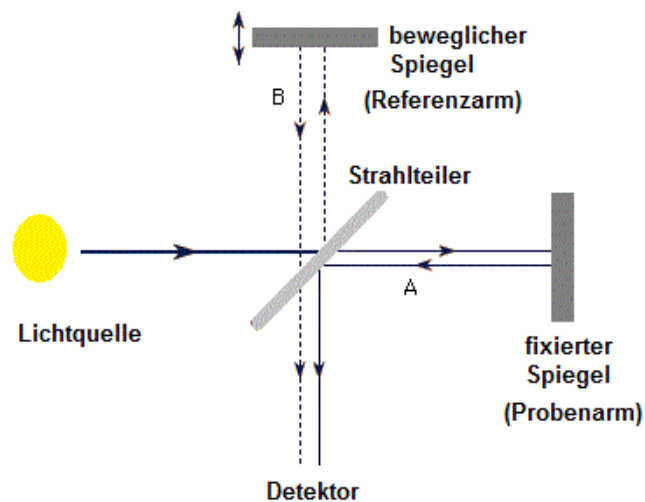


Abb.1: Prinzip des Michelson- Interferometers

Die OCT basiert auf dem Prinzip der Weißlichtinterferometrie auf Grundlage des Michelson-Interferometers, wie es in Abb. 1 dargestellt ist. Es ermöglicht die Messung von Distanzen mit Hilfe der Interferenz von spektral kurzkohärentem, breitbandigem Infrarotlicht. Zu diesem Zweck wird das aus der Lichtquelle generierte Licht über einen optischen Strahlteiler in einen Referenz- und einen Probenstrahl aufgeteilt. Je nach Gewebeeigenschaften streut bzw. reflektiert das untersuchte Gewebe das Licht aus dem Probenstrahl, und dieses wird nun über den Strahlteiler mit dem Licht im Referenzarm korreliert und zum Detektor geführt. Dieser vergleicht nun die Laufzeit beider Strahlen. Da Interferenz zwischen den beiden Strahlen nur auftreten kann, wenn die vom Licht zurückgelegte Wegstrecke sowohl im Proben-, als auch im Referenzstrahl zusammenpasst, wird auch nur dann das Intensitätssignal aufgenommen. [Schmitt 1999]

Die Rückstreuintensität entspricht hierbei der Amplitude des registrierten Interferenzsignals. Gleichen sich die zurückgelegten Distanzen in beiden Armen, so stehen die Phasen beider Lichtwellen gleich und ihre Amplituden addieren sich, es kommt zur sogenannten konstruktiven Interferenz. Von destruktiver Interferenz spricht man, wenn beide Arme gegenphasig laufen und sich so gegenseitig auslöschen.

Licht, das nicht aus diesem Fokusbereich reflektiert wurde, sondern aus tiefer oder höher gelegenen Schichten stammt, ergibt also aufgrund unterschiedlicher Laufzeiten keine Interferenz, so dass dieses Signal vom Detektor nicht verwendet wird.

Während bei der time domain-OCT (TD-OCT) die Eindringtiefe noch durch eine Veränderung der Länge des Referenzarms variiert wird [Podoleanu 2005], wird dies bei der spectral domain-OCT (SD-OCT) durch Messung des Spektrums der interferierenden Strahlung am Interferometerausgang erreicht. Aus den gemessenen Daten werden dann

Streuintensität und Abstand durch mathematische Transformation errechnet. [Wisweh 2010] Der grundlegende Aufbau beider Geräte ist in Abb. 2 dargestellt. Die Verwendung der SD-OCT als Weiterentwicklung der TD-OCT bringt eine Erhöhung der Messgeschwindigkeit bei einer verbesserten Auflösung, was sich durch den Aufbau erklärt.

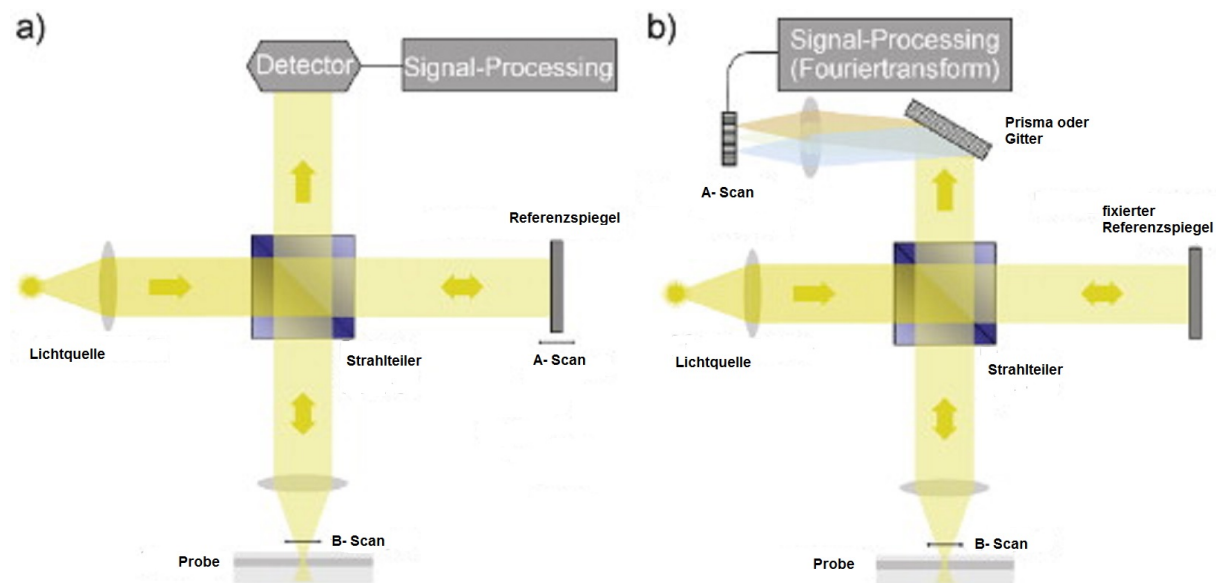


Abb.2: Prinzip des OCT- Aufbaus. a) time domain OCT: die darzustellende Tiefe wird durch Verschieben des Referenzspiegels erreicht. b) Bei der frequency domain bzw. spectral domain OCT ist ein Variieren des Referenzarms nicht mehr nötig, diese Funktion übernimmt ein Spektrometer.

modifiziert nach [Johansson et al. 2008]

Analog zur Bildgebung beim Ultraschall wird das Ergebnis der Messung als A-Scan (amplitude mode) bezeichnet. Ein laterales Abtasten erlaubt dann durch Aneinanderreihung vieler einzelner A-Scans das Erzeugen eines zwei- bzw. dreidimensionalen Querschnitts der Probe als B-Scan.

Die registrierten Daten entstehen durch die spezifischen Reflektions- und Streuvorgänge. Diese stattfindenden Prozesse beruhen primär auf Unterschieden in den Brechungsindizes der beteiligten Gewebe. [Tuchin 2007] Epitheliales Gewebe besitzt andere Streuungs- und Reflektionseigenschaften als z.B. subepitheliales Bindegewebe, so dass diese Schichten im OCT-Bild unterschieden werden können. [Drezek et al. 1999] Im Epithel der Stimmlippe sind hauptsächlich die Zellkerne und weitere Zellorganellen für die von der Umgebung abweichenden Brechungsindizes verantwortlich. [Drezek et al. 1999] Im subepithelialen Bindegewebe, der Lamina propria, finden sich Elastin- und Kollagenfasern, ultrastrukturell aufgebaut aus bis zu wenigen Millimeter langen Mikrofibrillen von 10-400 nm Durchmesser.

Die Strahlintensität des reflektierten Lichts aus dieser Schicht ist, verglichen mit dem Epithel, deutlich erhöht. [Drezek et al. 1999]

In dysplastischem Gewebe kann es aufgrund der erhöhten Dichte an Zellorganellen wie Mitochondrien und Zunahme an Zahl und Größe der Zellkerne zu einer verstärkten Intensität des zurückgestrahlten Lichts kommen. Dies kann dazu führen, dass Epithel mit höhergradiger Dysplasie und subepitheliales Gewebe nur noch so geringe Kontrastunterschiede zeigen, dass sich im OCT-Scan diese beiden Schichten nicht mehr klar differenzieren lassen. [Arifler et al. 2003]

## **1.6 Konfokale Mikroskopie**

Die konfokale Mikroskopie oder konfokale Endomikroskopie (CEM) basiert auf dem Grundprinzip, dass Marvin Minsky 1955 [Minsky 1988] erstmals entwickelt hat. Sie arbeitet grundlegend vergleichbar mit der Technik eines konventionellen Lichtmikroskops, bei dem die Auflösung durch die numerische Apertur und die Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle definiert ist. Eine niedrige Wellenlänge zur Erhöhung der Auflösung wird durch den Einsatz eines Lasers als Lichtquelle erreicht, daher spricht man bei den heute eingesetzten Geräten auch von Laser-Scanning Konfokalen Mikroskopen (LSCM).

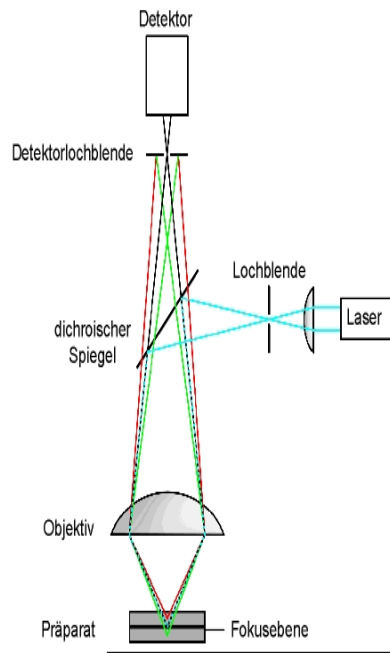


Abb.3: Schema des Strahlengangs zur Fokusabbildung. Während Licht aus höher (rot) und tiefer (grün) gelegenen Ebenen durch die Lochblende gefiltert wird, gelangt Licht aus der eingestellten Ebene zum Detektor. Analog gilt dies auch für benachbarte Punkte einer Ebene. [Lohr 1998]

Die höhere Detailschärfe erreicht die konfokale Mikroskopie hierbei durch ein starkes Fokussieren des Laserstrahls über eine Linse auf einen kleinen Ausschnitt des Präparats, den Fokus. Das von diesem Punkt reflektierte Licht wird nun durch die Linse auf den Detektor des konfokalen Mikroskops fokussiert, dem durch seine Lage hinter einer Lochblende nur die reflektierte Strahlung aus dem scharf abgebildeten zentralen Fokus zugeführt wird. Der konfokale optische Aufbau beleuchtet also nur selektiv den fokussierten Bereich, und detektiert Licht nur aus einem engen Tiefenbereich. Reflexionen aus tiefer oder höher gelegenen Ebenen werden dadurch wie in Abb. 3 dargestellt weitgehend unterdrückt, ebenso geschieht das innerhalb einer Ebene bei benachbarten Punkten. Sowohl der Beleuchtungs-, als auch der Detektionsaufbau fokussieren also auf denselben Punkt, sie arbeiten also konfokal.

Erreicht wird hierdurch eine hochauflösende Punktaufnahme des eingestellten Bereichs, im Gegensatz zur klassischen Übersichtsaufnahme des Lichtmikroskops. Durch Verschieben in lateraler Richtung, also der x- und y- Achse, kann hieraus in einer Schicht ein zweidimensionales Bild erstellt werden, indem rasterförmig Aufnahmen gemacht und

dargestellt werden. Eine Veränderung in axialer Richtung, d.h. der z- Achse, kann hieraus einen dreidimensionalen Scan des Gewebes entstehen lassen. Serienaufnahmen in verschiedenen Tiefen lassen sich zusammenführen und als Sequenzen betrachten, häufig auch als „virtuelle Biopsie“ [Amos und White 2003] [Kiesslich et al. 2004] oder als „Laser-Scanning-Tomography“ [Webb et al. 1987] bezeichnet.

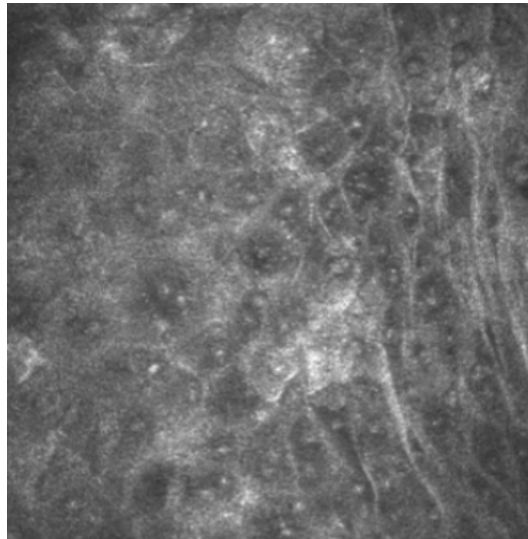


Abb.4: Ausschnitt einer Oberflächenaufnahme der entnommenen Gewebeprobe. Zellgrenzen und -kerne sind deutlich erkennbar. Durch Veränderung der Ebene lassen sich nun fortlaufend Aufnahmen aus tieferen Ebenen erstellen, um einen Volumenscan zu erhalten. Alternativ lässt sich auch unter Beibehaltung der Ebene die Oberfläche weiter untersuchen.

## 1.7 Problemstellung

### **Diagnosestellung bei klinisch suspekten epithelialen Stimmlippenveränderungen**

Studien belegen einen Zusammenhang zwischen der Zeitspanne, die vom Aufsuchen des Klinikers durch den Patienten bis zur Diagnose und Therapie verstreicht und einem höheren Tumorstadium. [Welge-Lüssen et al.1996] Amar beschrieb hierzu einen Median von 49 Tagen, der zwischen der ersten Bewertung und der Behandlung liegt. [Amar et al. 2010] Allison zeigte, dass eine Behandlungsverzögerung von mehr als einem Monat bereits einen negativen Einfluss auf das diagnostizierte Stadium zu haben scheint. [Allison et al. 1998]

Auch wird bei trotz negativer Biopsie fortbestehendem klinischen Verdacht oder geäußertem Karzinomverdacht durch den Pathologen eine Re-Biopsie empfohlen. [Welge-Lüssen et al. 1996] Jede Biopsie am Epithel der Stimmlippen birgt allerdings die Gefahr einer Stimmverschlechterung bis zum -verlust. [Theissing 2006]

Eine schnelle und klar festgelegte Diagnosestellung und Entscheidungsfindung bezüglich des weiteren Vorgehens ist also von großer Bedeutung für die Prognose des Patienten.

Hier stehen verschiedene Hilfsmittel zur Diagnostik des suspekten Stimmlippenbefunds zur Verfügung, wie sie z.B. Jerjes in seinem Review beschreibt. [Jerjes et al. 2011] Mit der optischen Kohärenztomographie und der konfokalen Endomikroskopie werden zwei dieser Techniken in dieser Arbeit hinsichtlich deren Eignung zur Diagnostik von Stimmlippenveränderungen untersucht.

Zu diesen beiden diagnostischen Verfahren gilt es zu eruieren, inwiefern sie zur Diagnostik bei unklaren Befunden beitragen können, so dass die Läsionen korrekt einer klinischen Entität zugeordnet werden können. Die Übereinstimmung zwischen der eingesetzten Technik und dem histopathologischen Befund ist also zu untersuchen.

### **Evaluation zur Beurteilung klinisch verdächtiger Stimmlippenläsionen**

Die Wahl des Orts zur Probenentnahme oder Exzisionsbiopsie bei einem makroskopisch suspekten Stimmlippenbefund kann zu unterschiedlich schweren Diagnosen in der histopathologischen Bewertung führen. Die Präzision beim Aufsuchen des Orts zur Entnahme einer repräsentativen Biopsie ist daher elementar bedeutsam für Stimmerhalt und Prognose des Patienten, auch in Bezug auf das erhöhte Risiko durch wiederholte Biopsien. [Welge-Lüssen et al. 1996]

Daher stellt sich die Frage, inwieweit die Entscheidung für einen bestimmten Entnahmeort sowie die direkte Einschätzung des makroskopischen Bilds abhängig ist von der Erfahrung des behandelnden Arztes.

Zur Klärung wurde ein Fragebogen entwickelt, mit dem im Rahmen einer monozentrischen Studie an der Rostocker Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Zusammenhang zwischen der Erfahrung des Beurteilenden und der korrekten Einschätzung der Läsion untersucht wurde.

## 1.8 Zielsetzung

Die optische Biopsie soll die Präzision der Probenentnahme bei suspekten Stimmlippenläsionen verbessern und zur Diagnostik bei klinisch primär unklaren Befunden beitragen.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einsatz einer optischen Biopsie mit Hilfe der optischen Kohärenztomographie und der konfokalen Endoskopie im Rahmen der primären Einschätzung und der Verbesserung der Probenentnahme zu untersuchen.

Mit der hier vorliegenden vergleichenden in-vivo Untersuchung an Patienten mit klinisch suspekten, aber makroskopisch nicht klar zuordenbaren epithelialen Veränderungen der Stimmlippen soll dieser Fragestellung nachgegangen werden.

Auch soll in dieser Arbeit eruiert werden, inwiefern eine Abhängigkeit zwischen der klinischen Beurteilung suspekter Läsionen des Stimmlippenepithels und der Erfahrung des behandelnden Arztes besteht.

Hierzu wurde eine monozentrische Pilotstudie an der HNO-Universitätsklinik Rostock durchgeführt, um der Frage nach diesem Zusammenhang nachzugehen.

## Material und Methoden

### 2.1 Einsatz von OCT und CEM

#### Verwendete Messtechniken

##### Optische Kohärenztomographie

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Operationsmikroskop Hi Res 1000 der Möller Wedel GmbH, Wedel, Deutschland mit integrierter Spectral-Domain-OCT- Technik verwendet, dass von der OptoMedical Technologies GmbH, Lübeck, Deutschland zur Verfügung gestellt wurde (Abb. 5 bzw. 6). Hierfür wurde ein OCT-System der Firma Thorlabs Inc., Newton, USA benutzt, welches mit einer lateralen Auflösung von ca.  $10,6\text{ }\mu\text{m}$  und einer longitudinalen Auflösung von ca.  $12\text{ }\mu\text{m}$  arbeitet. [Lankenau et al. 2013] In die Tiefe ermöglicht diese Technik eine Reichweite von bis zu 4 mm. [Lankenau et al. 2013] [Wisweh 2010] Aufgrund der Gewebeeigenschaften in Bezug auf Streuung konnte am Larynx eine Tiefe von 1 bis max. 1,5 mm dargestellt werden. Der umgewandelte OCT-Scan erbringt eine Tiefe von 1024 Pixeln, der Abstand zwischen zwei benachbarten Pixeln beträgt ca.  $4,1\text{ }\mu\text{m}$  in Luft bzw.  $3,1\text{ }\mu\text{m}$  im Gewebe, bei einem zu beachtenden Refraktionsindex von 1,34. [Lankenau et al. 2013]

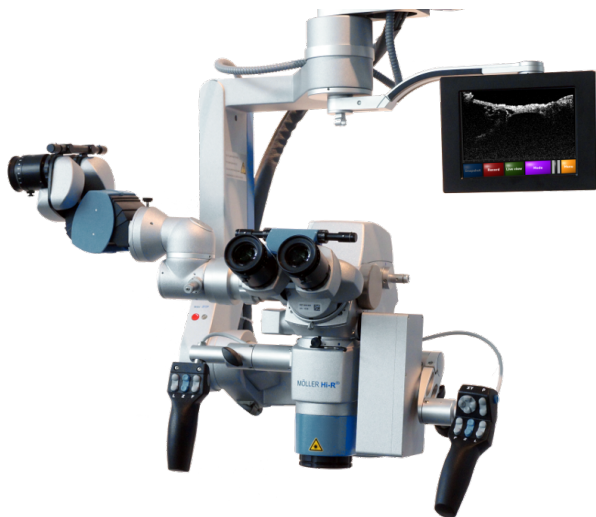


Abb.5: OP- Mikroskop Hi Res 1000 mit integriertem OCT- Scankopf und M.Dis- Touchscreen zur Bedienung der OCT [Lankenau 2013]



Abb.6: Basiseinheit der verwendeten OCT- Technik [Lankenau 2013]

Die OCT-Messung wurde im Nonkontaktverfahren durchgeführt. Der mögliche



Arbeitsabstand zur korrekten Abbildung der untersuchten Strukturen lag zwischen 220 mm und 500 mm. [Lankenau et al. 2013] Dieser wurde automatisch durch das Gerät detektiert und angezeigt.



Abb.7: Einsatz der OCT- Einheit im OP

Durch Mikrolaryngoskopie wurde die Sicht auf den Larynx ermöglicht. Der Monitor am oberen Bildrand zeigt den OCT- Scan des eingestellten Bereichs der Stimmlippe in Echtzeit. Der links im Bild sichtbare Monitor ermöglicht über einen Videoport am OP-Mikroskop Foto- und Videoaufnahmen der im Fokus liegenden Bereiche. Rechts am Mikroskop angeschlossen ist noch ein Beobachterport, so dass ein zweiter Untersucher die eingestellten Bereiche in Augenschein nehmen kann. [Foto: Prof.Dr. Tino Just]

Die verwendete OCT-Technik arbeitet mit einer Lichtleistung von 3mW und einer Wellenlänge von 840 nm. Durch ihre Nähe zum Wellenlängenbereich von sichtbarem Licht ist es so möglich, denselben Strahlengang für OCT und Videolaryngoskopie zu nutzen. Die OCT-Kamera wurde über einen Kameraport an das Operationsmikroskop angeschlossen, so dass der Operateur mit Sicht auf die zu untersuchende Region den OCT-Scan durchführen konnte. Durch einen grünen Pilotstrahl konnte das Scanfeld exakt eingestellt werden (siehe Abb. 8). Die Bedienung erfolgte über das OP-Mikroskop und einen angeschlossenen Touchscreen-Monitor. Dieser wurde hierzu steril abgedeckt, so dass die gesamte Durchführung des OCT- Scans alleine durch den Operateur erfolgen konnte. Während der Einstellung des zu untersuchenden Feldes ist über den Touchscreen durchgehend ein Echtzeit-iOCT- Bild verfügbar. Der prinzipielle Aufbau ist auch in obenstehender Abbildung zu sehen. Die verwendete Kamera ermöglichte pro Sekunde ca. einen B- Scan, bestehend aus 1000 A-

Scans.

Insgesamt verlängerte sich die OP-Dauer der Mikrolaryngoskopie durch das Einstellen des Fokus und die Aufnahme der Scans um 1 bis maximal 5 Minuten.

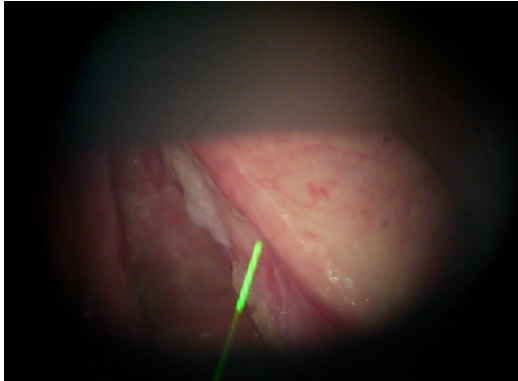


Abb.8: Im Bild erkennbar ist der grüne Pilotlaserstrahl.

Die zu untersuchende Läsion wurde eingestellt, die OCT- Untersuchung findet statt. Der grüne Pilotlaser zeigt währenddessen zeitgleich den Bereich an, der mit der OCT- Einheit aufgenommen wird.

### **Konfokale Mikroskopie**

Zur Anwendung kam ein modifizierter Heidelberg Retina Tomograph II (HRTII) (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland), wie er bereits in verschiedenen Arbeiten [Just und Pau 2013] [Just et al. 2011] [Farahati et al. 2009] [Just et al. 2009b] auf der Grundlage des von Stave et al. [Stave et al. 2002] vorgestellten Heidelberg Retina Tomograph I verwendet wurde und in den Abb. 9 und 10 dargestellt ist. Dieser wurde mit dem Rostock Cornea Modul (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) als Linsensystem gekoppelt. Als Lichtquelle diente ein 670 nm Diodenlaser. Das System wurde mit einem starren Endoskop kombiniert, welches bereits in vorhergehenden Studien an der Rostocker Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde zum Einsatz kam [Farahati et al. 2009] [Just et al. 2011] [Just und Pau 2013] und in Abbildung 12 zu sehen ist. Hierbei wurde der Prototyp eines starren Endoskops (Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) mit einer Länge von 23 cm und einem Durchmesser von 5 mm verwendet, welches auch autoklavierbar ist. Um dieses mit dem HRT II verwenden zu können wurde die  $\lambda/4$ - Platte entfernt, um zu starke Reflektionen zu vermeiden.



Abb.9: HRT II mit angebrachtem Rostock Cornea Modul

[<http://www.heidelbergengineering.com/international/products/hrt/hrt-cornea/> ; abgerufen:25.03.2013]

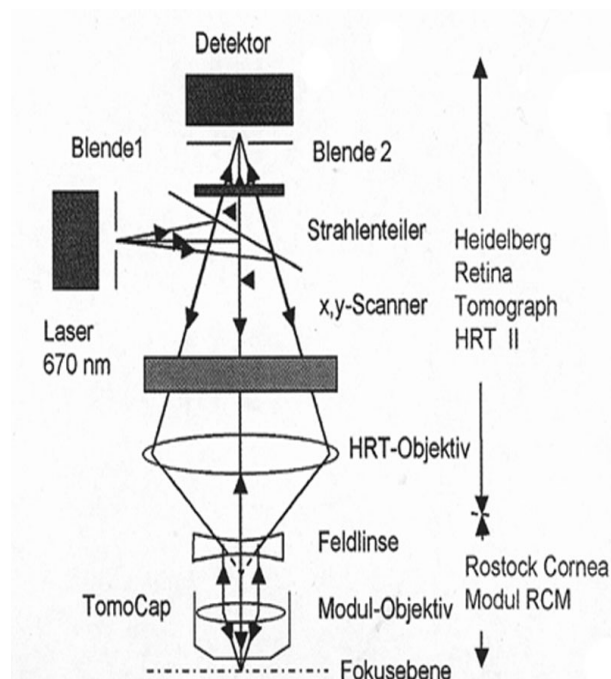


Abb.10: Prinzipieller Aufbau eines Laser-Scanning konfokalen Mikroskops am Beispiel der für diese Arbeit verwendeten Konfiguration. Vom Laser als Lichtquelle geht der Strahlengang zum Strahlenteiler, der das Licht über die verschiedenen Objektive auf die Untersuchungsebene lenkt. Die Reflektionen erreichen nun durch den Strahlenteiler die Blenden, die nur das Licht aus der fokussierten Ebene zum Detektor lassen. [Bailly et al. 2006]

Das starre Endoskop enthält mehrere Stablinsen sowie ein Mikroskopobjektiv mit einem Durchmesser von 3,5 mm. Benachbarte Stablinsen sind durch eine flexible und transparente Klebung miteinander verbunden, welche das Licht nicht streut oder die Bildqualität mindert. Sie besitzt optische Eigenschaften, die sehr nahe an die von Glas heraneichen.

Die numerische Apertur des Aufbaus ist durch das Endoskop begrenzt und beträgt hier 0,9.

Der Aufbau ist schematisch in Abb. 11 dargestellt.

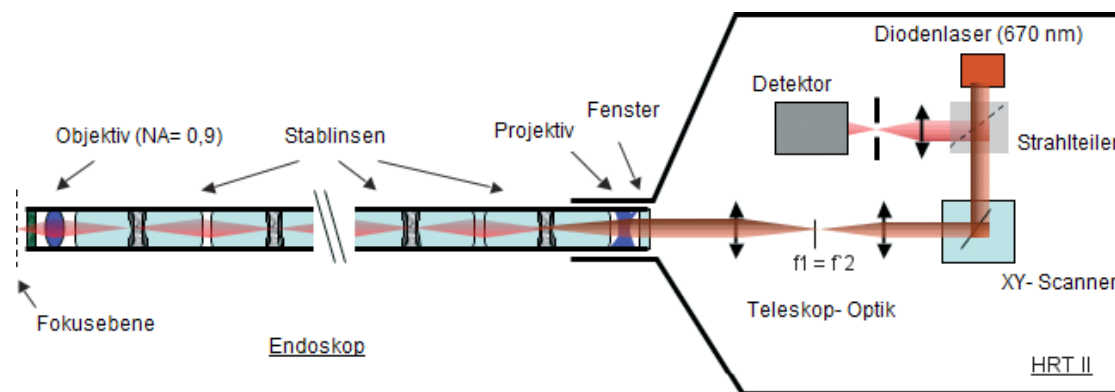


Abb.11: Schematischer Aufbau des verwendeten starren Endoskops, welches an den HRT II gekoppelt wurde. Hellblau im Endoskop dargestellt ist die transparente Klebung, die die einzelnen Stablinsen miteinander verbindet.

Modifiziert nach [Farahati et al. 2009]

Mittels eines hierfür entwickelten Konnektors (KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), welcher in Abb. 12 gezeigt wird, lässt sich das Endoskop an den HRT II anschließen, der Konnektor erlaubt auch das manuelle Einstellen der Ebene im Gewebe.

HRT II, der Konnektor und das Endoskop sind CE- zertifiziert.

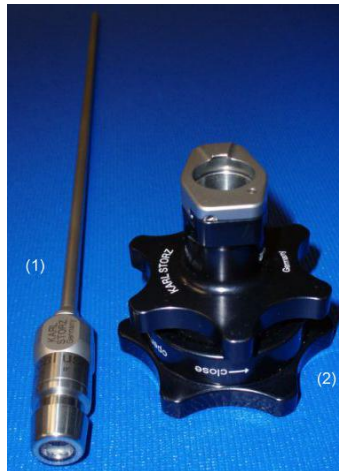


Abb.12: Starres Endoskop (1) und Konnektor (2), Karl Storz GmbH & Co KG, Tuttlingen

Der Konnektor ermöglicht das Anschließen des Starren Endoskops an die Scan- Einheit des HRT II. Ebenso erfolgt die Tiefeneinstellung im untersuchten Gewebe mittels dieses Konnektors.

[Foto: Prof.Dr. Tino Just]

Dieser Aufbau erlaubte die Aufnahme eines Bildausschnitts von  $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$  bei einer Auflösung von  $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ . Die Bildgröße betrug  $384 \times 384$  Pixel mit einer digitalen Bildauflösung von ungefähr  $1\ \mu\text{m}/\text{Pixel}$  transversal und  $2\ \mu\text{m}/\text{Pixel}$  longitudinal.

Um zu gewährleisten, dass die mittels OCT untersuchte Region der Stimmlippe exakt der Region entspricht, die mit dem konfokalen Laserendoskop untersucht und letztlich biopsiert wird, wurde erst biopsiert/exzidiert und noch intraoperativ die konfokal-mikroskopische Untersuchung vorgenommen. Mit diesem Vorgehen sollte verhindert werden, dass die mit der CEM untersuchte Geweberegion letztlich nicht dem histopathologischen Ergebnis zugeordnet werden kann. Von Vorteil war hierbei auch, dass trotz der kurzen Untersuchungszeit (OCT und CEM) eine Narkosedauer von 10 Minuten nicht überschritten werden musste.

Die Einstellung auf die gewünschte Ebene in der z-Achse des Epithels erfolgte am Konnektor. Diese Untersuchungstechnik gewährleistete eine Vergleichbarkeit beider verwendeten diagnostischen Methoden.

Die konfokal-mikroskopische Untersuchung ermöglichte sowohl das Aufnehmen einzelner Bilder, als auch von Volumenscans in die Tiefe sowie Sequenzaufnahmen in horizontaler und vertikaler Richtung. Bei den Volumenscans wurden Schichtabstände von ca.  $2\ \mu\text{m}$

verwirklicht, was bei 40 Schichtbildern pro Scan einer Tiefe von 80  $\mu\text{m}$  entspricht, ausgehend von der zuvor manuell eingestellten Ausgangsebene. Die maximale Eindringtiefe lag bei ungefähr 300  $\mu\text{m}$ . Die Aufnahmedauer eines solchen Volumenscans betrug ungefähr 6 Sekunden. Des Weiteren ließen sich Sequenzen aufnehmen, bei denen manuell die Gewebeprobe vor dem Focus bewegt wird und dies als Videoscan gespeichert wird. Hierbei sind bis zu 100 Einzelbilder speicherbar.

Pro Patient und Gewebeprobe wurden mehrere Sequenzen und Volumenscans durchgeführt und abgespeichert, anschließend wurden sie in eine Datenbank überführt.

In den abgespeicherten Daten wurde durch den Untersucher nach atypischen Zellen gesucht, und die Zellarchitektur im Zellverband beurteilt. Diese wurden dann in Relation zur Schichttiefe im Gewebe den entsprechenden Dysplasiegraden zugeordnet. [Gale et al. 2005] Dieses Vorgehen fand bereits in anderen Arbeiten an der Universitätsklinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde Rostock Anwendung [Just et al. 2012a] [Just et al. 2011] [Just und Pau 2013], so dass hier vergleichbare Bilder zu den einzelnen dysplastischen Schweregraden in einer Datenbank vorlagen, die zur Einarbeitung hinzugezogen werden konnten.

## **Patienten und Datengewinnung**

Für diese Arbeit wurden Patienten der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Rostock eingeschlossen, bei denen der klinische Verdacht auf ein frühinvasives Karzinom bestand oder eine seit drei Wochen bestehende Heiserkeit vorlag.

Alle Patienten wurden über das Untersuchungsverfahren sowie die möglichen Risiken aufgeklärt. Die in dieser Arbeit benutzten Untersuchungsmethoden wurden von der Ethikkommission der Universität Rostock geprüft und genehmigt. Nach erfolgter schriftlicher Einwilligung der Patienten wurden diese einer Mikrolaryngoskopie bzw. einer Panendoskopie mit Probenentnahme zugeführt. Im Rahmen dieses Eingriffs wurde eine intraoperative Diagnostik mittels OCT durchgeführt sowie eine Probenentnahme zur direkt anschließenden ex-vivo-CEM-Untersuchung. Die Eingriffe erfolgten in Allgemeinanästhesie.

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten älter als 18 Jahre mit Heiserkeit und bzw. oder

suspekten, abklärungsbedürftigen Veränderungen an den Stimmlippen.

Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie waren der klinische Verdacht auf ein Larynx-Karzinom (T1 bis T4), ein Rezidivverdacht bei bekanntem bzw. behandeltem Larynx-Karzinom sowie Patienten, bei denen keine Indikation zur Probenexzision bestand, des Weiteren auch der Widerruf der Studienteilnahme durch den Patienten. Es wurden nur Patienten berücksichtigt, bei denen es sich um einen Primärfall handelte.

Die Studie umfasst 67 Patienten, bei denen entnommene Gewebeproben ex vivo mit dem konfokalen Mikroskop untersucht wurden. An 39 dieser Patienten wurde zusätzlich zunächst intraoperativ während der Mikrolaryngoskopie der suspekte Befund mittels OCT untersucht. Die Untersuchung mit dem konfokalen Mikroskop erfolgte ex-vivo noch intraoperativ oder direkt im Anschluss postoperativ, um eine Vergleichbarkeit der eingesetzten Bildgebung mit der Histopathologie zu ermöglichen.

Bei Patienten, die mehrere Läsionen an verschiedenen Orten, z.B. auf beiden Stimmlippen, aufwiesen, wurde jede Läsion als einzelner Fall gezählt.

Dadurch ergab sich bei der Begutachtung mit dem konfokalen Mikroskop eine Gesamtzahl von 97 untersuchten Proben an 67 Patienten.

Von den 67 Patienten, bei denen suspekte Befunde untersucht wurden, waren 29 weiblich und 48 männlich. Bei einer Altersspanne von 40 bis 82 Jahren ergab sich ein Mittelwert von 60,9 Jahren mit einer Standardabweichung von 11,2 Jahren.

Für die OCT-Untersuchung sowie die vergleichende Untersuchung von OCT und CEM wurden von 39 Patienten insgesamt 47 suspekte Bereiche untersucht. Diese Patienten waren alle Bestandteil der ex vivo- Untersuchung mittels konfokaler Mikroskopie.

Aufgrund des zum Zwecke dieser Arbeit leihweise zur Verfügung gestellten OP-Mikroskops mit OCT-Technik war eine Untersuchung an der Gesamtheit von 67 Patienten bzw. 97 suspekten Läsionen nicht möglich.

Das Patientenkollektiv, an dem sowohl eine OCT- als auch eine konfokal-mikroskopische Untersuchung durchgeführt wurde, enthielt Patienten im Alter von 44 bis 82 Jahre (Mittelwert 62,4 Jahre  $\pm$  11,0 Jahre). 10 Patienten waren weiblich, 29 männlich.

Zur Darstellung des Larynx wurden Laryngoskope nach Kleinsasser [Kleinsasser 1962] verwendet. Nach Aufsuchen des zu untersuchenden Befundes an der Stimmlippe wurde der makroskopische Befund zunächst unter Verwendung eines Datenarchivierungssystems (AIDA, KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) videodokumentiert.

Im Anschluss wurde die OCT aktiviert. Die gesamte Bedienung zur Aufnahme erfolgte durch den Operateur am OP-Mikroskop sowie am Touchscreen-Monitor. Ein OCT-Volumenscan durch die gesamte Stimmlippe wurde durchgeführt, dieser wurde abgespeichert. Eine direkte Beurteilung der Aufnahme erfolgte am Touchscreen, so dass bei qualitativ schlechten Daten der Scan wiederholt werden konnte.

Nach der OCT-Diagnostik erfolgte aus den entsprechenden Bereichen eine Probenentnahme bzw. eine Exzision, welche ex vivo mittels des an das konfokale Mikroskop angeschlossenen Endoskops untersucht wurde. Zum Schluss erfolgte die histopathologische Untersuchung, welche am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt wurde.

## **Datenauswertung**

### **Optische Kohärenztomographie**

Die gewonnenen OCT-Scans wurden digital im .raw-Format gespeichert und zur Auswertung in eine Datenbank überführt. Der volle Volumenscan umfasste hierbei 30 Einzelscans, die mit Hilfe des Programms ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) als Volumen dargestellt wurden. Dieses ließ sich nun Bild für Bild durchfahren oder es konnte eine Filmsequenz erstellen.

Zunächst wurden die Daten als .raw-Datei mit der Grundeinstellung einer Größe von 1024 Pixeln in der Höhe und 1000 Pixeln in der Breite in das Programm importiert, im Anschluss erfolgte je nach Aufnahme noch ein Drehen bzw. Spiegeln des Bildes, so dass die Oberfläche nach oben zeigte. Das Bild bzw. die Bildfolge wurde in 8-bit konvertiert, Parameter wie Kontrast und Helligkeit wurden nachreguliert. Dann wurde die Grenzschicht zwischen Epithel und subepithelialelem Raum aufgesucht und auf ihre Integrität hin untersucht. Im Anschluss wurde die größte Ausdehnung der Epitheldicke im Scan ausgemacht. Diese wurde aus der Länge in Pixeln in das metrische System überführt. Hierzu musste ein Refraktionsindex von



1,34 beachtet werden. Durch die automatische Detektierung und Umrechnung des Arbeitsabstands der OCT-Einheit zum gescannten Gewebe entsprach daher ein Pixel im dargestellten OCT-Scan einer Strecke von 3,13  $\mu\text{m}$ .

Die Daten wurden anschließend im .avi- Format für Volumendatensätzen bzw. als .jpg für Einzelbilder abgespeichert und in eine Datenbank integriert.

Die OCT-Daten wurden von zwei Untersuchern verblindet ohne Kenntnis der histologischen Befunde untersucht. Untersuchungskriterien waren hierbei primär die gemessene Epitheldicke, als weitere Hilfe wurden der horizontale Schichtaufbau des Gewebes, die Signalintensität der Epithelschicht sowie die Integrität der Basalmembran als erkennbare Grenze zwischen Epithel und Lamina propria begutachtet.

Ausgewertet wurden die Epitheldicke und die Integrität der Grenzschicht zwischen Epithel und subepithelialelem Raum. Diese wurde aus zehn Messungen im Bereich des suspekten Befunds gemittelt. Anschließend wurde ein Mittelwert aus den Ergebnissen beider Untersucher berechnet.

Die Ergebnisse wurden schließlich in einer Excel-Tabelle gespeichert.

Wie in Tab.2 dargestellt, wird eine Unterscheidung zwischen benignen Veränderungen wie Hyperplasien und einer geringen bis moderaten Dysplasie („low grade SIL“) auf der einen und einer schweren Dysplasie, einem Carcinoma in situ und mikroinvasiven Plattenepithelkarzinomen („high grade SIL“) auf der anderen Seite vorgenommen. Die Zuordnung der moderaten Dysplasien zu den „low-grade SIL“ basiert hierbei auf dem Konsensuspaper zur Diagnostik und Therapie von laryngealen Dysplasien von Mehanna et al., welches auf Basis einer Konferenz von 40 Pathologen und 40 Chirurgen aus dem Bereich der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde erstellt wurde. Hier werden die schwere Dysplasie und das Carcinoma in situ als „high-grade lesion“, die geringe und moderate Dysplasie als „low-grade lesion“ definiert. [Mehanna et al. 2010]

Zur Differenzierung zwischen high-grade und low-grade Läsionen wurde ein Cut-Off-Wert festgelegt. Kraft et al. beschrieben Mittelwerte für Epitheldicken bei verschiedenen Dysplasiegraden und des normalen Epithels. [Kraft et al. 2008] Hier wurde beispielsweise für die geringe Dysplasie ein Mittelwert von 258  $\mu\text{m}$  bei einem Minimalwert von 208  $\mu\text{m}$  aus 45 Präparaten angegeben.

Entgegen der von Kraft et al. publizierten Werte wurde der Grenzwert bei einer Epitheldicke von 180  $\mu\text{m}$  die Grenze gesetzt. Die Festlegung des cut-offs auf 180  $\mu\text{m}$  erfolgte hierbei willkürlich und basiert auf Messungen von Voruntersuchungen an Patienten mit Dysplasien verschiedener Schweregrade an der Universitätsklinik für HNO-Heilkunde und dem Institut für Pathologie Rostock.

Die Bilder der optischen Kohärenztomographie wurden nach der Auswertung vom Untersucher in zwei Klassen unterteilt und kodiert. Eine Epitheldicke kleiner oder gleich 180  $\mu\text{m}$  wurde als low-grade SIL festgelegt, beim Vorliegen einer Epitheldicke von mehr als 180  $\mu\text{m}$  wurde dies als high-grade SIL definiert. Die Ergebnisse wurden dann wiederum in eine Excel-Tabelle eingetragen.

### **Konfokale Mikroskopie**

Die für die konfokale Mikroskopie entnommenen Gewebeproben wurden postoperativ mit dem beschriebenen Modell untersucht. Die als Einzelbilder im .jpg- Format gespeicherten Bilder wurden zu .mov- Videodaten umgewandelt. Die so abgespeicherten Volumen- und Sequenzdaten wurden von 2 Untersuchern ebenfalls verblindet ohne Kenntnis des histopathologischen Befunds beurteilt. Es wurde gemäß Tab.1 nach Zellatypien wie Zellkernveränderungen oder superfiziellen Mitosefiguren gesucht sowie die Integrität des Zellverbands und die Zellgrenzen beurteilt, ähnlich wie dies bei der konventionellen Histopathologie geschieht, und diese in Relation zur Epithelschicht gesetzt.

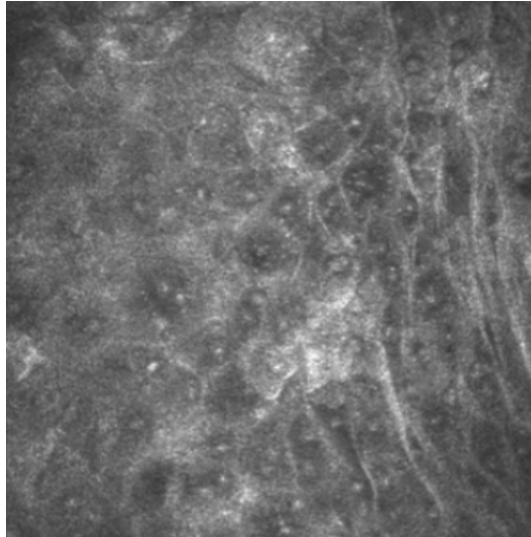


Abb.13: Ausschnitt einer Oberflächenaufnahme der entnommenen Gewebeprobe. Zellkerne sind deutlich erkennbar und regulär geformt, die Zellgrenzen lassen sich gut darstellen. Es zeigt sich kein Anhalt für Zellatypien.

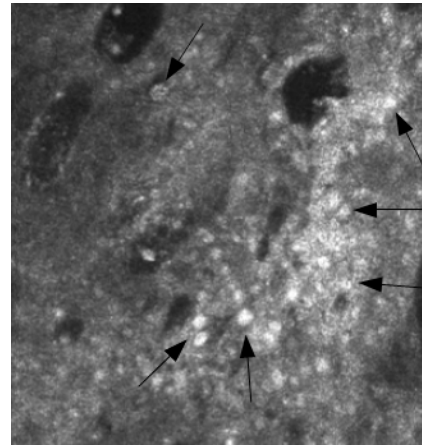


Abb.14: Bei der Untersuchung dieser Probe fanden sich vergrößerte und irregulär geformte Zellkerne durch die gesamte Epithelschicht, hier sind einige beispielhaft mit Pfeilen markiert. Die in der rechten Bildhälfte sichtbare Aufhellung mit vermehrt auffallenden Zellen und Zellkernen lässt sich ebenfalls in die Tiefe verfolgen und scheint sich in der Diagnose eines mikroinvasiven Karzinoms widerzuspiegeln.

Anschließend wurden die Datensätze, analog dem Verfahren bei der Auswertung der OCT-Daten, in zwei Klassen unterteilt. Analog zur Zuordnung in der OCT-Untersuchung wurde keine und eine geringe bis moderate Dysplasie als „low grade SIL“, schwere Dysplasien, ein Carcinoma in situ oder ein mikroinvasives Plattenepithelkarzinom als „high grade SIL“ klassifiziert. Die Ergebnisse wurden ebenfalls in eine Excel- Tabelle überführt.

## Statistik

Für die beiden verwendeten diagnostischen Methoden wurden Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert sowie die Vorhersagegenauigkeit berechnet, als Referenz wurden die histologischen Befunde aus der Pathologie herangezogen, welche zur besseren Vergleichbarkeit alle von demselben Pathologen (Prof.Dr. Prall, Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Rostock) befundet wurden. Hierzu wurden die Präparate standardisiert in 4% Formaldehyd-Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und nach Anfärbung

mit Hämatoxylin und Eosin untersucht. Im Anschluss erfolgte ein Vergleich beider Verfahren. Die histopathologische Auswertung erfolgte anhand der WHO-Kriterien [Gale et al. 2005] und wurde wie in Tab. 2 dargestellt in die Kategorien „low grade SIL“ und „high grade SIL“ überführt.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten aus der konfokalen Mikroskopie wurde sowohl für alle 97 entnommenen Gewebeproben insgesamt vorgenommen, als auch für die 47 Patienten, die mittels konfokaler Mikroskopie und OCT untersucht wurden. Dies ermöglichte den Vergleich beider Methoden bzw. deren Zusammenspiel in der Diagnostik.

Die Berechnung der statistischen Parameter aus den gewonnenen Daten erfolgte für jede Untersuchungstechnik einzeln anhand folgender Festlegungen:

RP → richtig positiv = Histologie und OCT bzw. KM positiv

FN → falsch negativ = Histologie positiv, OCT bzw. KM negativ

RN → richtig negativ = Histologie und OCT bzw. KM negativ

FP → falsch positiv = Histologie negativ, OCT bzw. KM positiv

Für die Berechnung im Zusammenspiel der beiden diagnostischen Verfahren wurden folgende Festlegungen gemacht:

RP → richtig positiv = Histologie positiv sowie OCT und/oder KM positiv

FN → falsch negativ = Histologie positiv sowie OCT und KM negativ

RN → richtig negativ = Histologie negativ sowie OCT und KM negativ

FP → falsch positiv = Histologie negativ sowie OCT und/oder KM positiv

Sensitivität:  $RP / (RP + FN)$

Die Sensitivität gibt den Anteil aus dem Patientenkollektiv an, bei dem bei Vorliegen der Erkrankung diese auch mittels des diagnostischen Verfahrens korrekt ermittelt wurde, im Rahmen dieser Arbeit also der Anteil von bei positivem histologischen Befund auch in der OCT bzw. KM als krank eingestuften Patienten an allen in der Histologie positiv befundeten Patienten.

Spezifität:  $RN / (RN + FP)$

Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit eines diagnostischen Verfahrens, nur kranke Personen zu erkennen und die Gesunden auszuschließen. Es wird hier also der Anteil der in OCT bzw. KM korrekt als low-grade SIL befundeten Patienten an allen erhoben, die im histologischen Befund mit keiner bzw. einer geringen bis moderaten Dysplasie eingestuft wurden.

Positiver prädiktiver Wert (PPW):  $RP / (RP + FP)$

Mit dem PPW wird angegeben, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine im diagnostischen Verfahren als krank eingestufte Person auch tatsächlich krank ist.

Negativer prädiktiver Wert (NPW):  $RN / (RN + FN)$

Der NPW beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass bei negativem OCT- bzw. KM- Befund (d.h. „0“) auch tatsächlich kein positiver Befund vorliegt.

Vorhersagegenauigkeit

Die Vorhersagegenauigkeit gibt den Anteil der korrekt befundeten Proben an, d.h. den Anteil der richtig positiv und richtig negativ bewerteten Befunde an allen Befunden.

[Kundt et al. 2014]

Um ein Maß für die Übereinstimmung der Ergebnisse darzustellen wurde die Interrater-Reliabilität für die Histopathologie und die jeweilige Untersuchungsmethode bestimmt. Dieses Maß der Reliabilität beschreibt den Grad der Übereinstimmung der Ergebnisse beider Untersuchungen. Sie wurde mittels Cohen's Kappa [Cohen 1960] [Grouven et al. 2007] abgeschätzt.

Cohen's Kappa wird mittels der Formel

$$\kappa = \frac{\left[ \rho_0 - \rho_E \right]}{\left[ 1 - \rho_E \right]}$$

berechnet.  $\rho_0$  steht hier für die tatsächlich beobachteten Übereinstimmungen,  $\rho_E$  für die

aufgrund von Zufall zu erwartenden Übereinstimmungen beider Untersuchungen.

Zur Berechnung des Kappa- Werts wurde das Programm SPSS 20 (IBM Corp., Armonk, USA) verwendet, in das die Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden eingegeben wurden.

Die ermittelten Werte für  $\kappa$  wurden nach Altman [Altman 1990] interpretiert, so dass als Richtwerte für die Stärke der Übereinstimmung folgendes gilt:

<u><math>\kappa</math>- Wert</u>	<u>Grad der Übereinstimmung</u>
< 0,20	schwach
0,21- 0,40	leicht
0,41- 0,60	mittelmäßig
0,61- 0,80	gut
0,81- 1,00	sehr gut

## **2.2 Verwendete Computersoftware**

Für die Textverarbeitung wurde Open Office Writer (Apache Software Foundation, USA) verwendet. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels SPSS 20 (IBM Corp., Armonk, USA) sowie Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, USA). Der Fragebogen wurde mit Microsoft PowerPoint (Microsoft Corp., Redmond, USA) erstellt. Die Verarbeitung der Bilddaten der OCT erfolgte mittels ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

## **2.3 Klinische Pilotstudie zur Beurteilung unklarer Stimmlippenläsionen**

Mikrolaryngoskopisch gewonnene Bilder von Stimmlippenveränderungen, zu denen die histopathologischen Befunde vorlagen, wurden Ärzten und Studenten der Rostocker Universitätsklinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde vorgelegt.

Die Bilder zeigten alle die in Mikrolaryngoskopie aufgenommenen Stimmlippen in der Übersicht, wie in Abb.15 und 16 beispielhaft dargestellt.

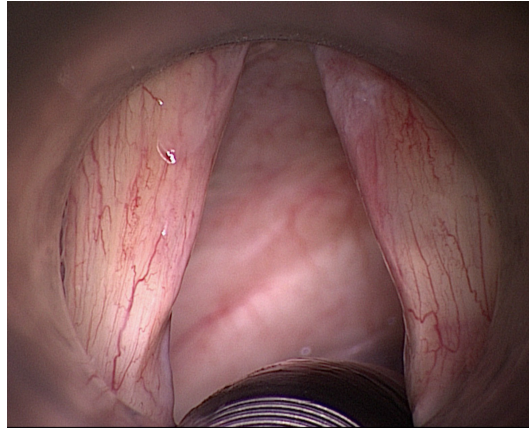


Abb.15: Bildbeispiel aus dem Fragebogen

Zu den ersten beiden Fragen wurde den Teilnehmern jeweils eine solche Aufnahme der Stimmlippen dargeboten.

Eingeschlossen wurden Ärzte der Rostocker HNO-Universitätsklinik und Medizinstudenten der Universität Rostock, die bereits an den Vorlesungen der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und der Onkologie teilgenommen hatten.

Hierzu wurde eine PowerPoint-Präsentation erstellt, der Antwortbogen wurde den Testpersonen parallel vorgelegt. Pro Frage wurde eine Minute zur Beantwortung vorgegeben.

Zunächst sollte sich jeder Teilnehmer einer Gruppe zuordnen. Als Möglichkeiten wurden erfahrene Kehlkopfchirurgen, HNO-Ärzte und Assistenzärzte in Weiterbildung mit wenig Erfahrung in der Kehlkopfchirurgie oder klinisch unerfahren vorgegeben.

Die Teilnehmer wurden gemäß ihrer Angabe in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe bildeten die erfahrenen Kehlkopfchirurgen mit zehn und mehr kehlkopfchirurgischen Eingriffen pro Jahr. Zur zweiten Gruppe gehörten HNO-Ärzte und Assistenzärzte in Weiterbildung mit wenig Erfahrung in der Kehlkopfchirurgie, die also pro Jahr weniger als zehn chirurgische Eingriffe am Kehlkopf durchführen. Die dritte Gruppe der klinisch Unerfahrenen bildeten Medizinstudenten der höheren klinischen Semester sowie PJ-Studenten, die sich aktuell im HNO-Tertial befinden. Insgesamt nahmen 22 Personen teil.

Es lagen acht Bildbefunde vor, zu denen jeweils drei Fragen gestellt wurden. Es wurden nur

Bilder von Läsionen verwendet, die sich klinisch nicht eindeutig einer bestimmten Entität zuordnen ließen. Ergänzende Informationen, wie z.B. Beweglichkeit bzw. Verschiebbarkeit des Epithels, Stroboskopie oder Stimmanalyse, wurden nicht dargeboten. Die Diagnose musste allein anhand des Bildbefundes gestellt werden.

Zu Beginn sollte angegeben werden, wie man den makroskopischen Befund histologisch sichern würde. Hierzu standen eine Exzision der gesamten Läsion, eine Probenentnahme sowie die subepitheliale Chordektomie zur Auswahl.

Dann sollte aufgrund des Bildbefunds eine klinische Verdachtsdiagnose abgegeben werden. Als Antwortmöglichkeiten vorgegeben wurden gesund, Entzündung/ Hyperkeratose/ Hyperplasie, geringe Dysplasie, moderate Dysplasie, schwere Dysplasie, Carcinoma in situ sowie ein Plattenepithelkarzinom.

Als letztes sollte für jede einzelne Region, für die ein Befund angegeben wurde bzw. aus denen laut Teilnehmer eine Probe entnommen werden sollte, eine der sechs obengenannten Verdachtsdiagnosen gestellt werden. Zu diesem Zweck wurden in den Bildern drei bis acht Regionen vorgegeben, beispielhaft in Abb. 16 zu sehen.

Die ausgefüllten Antwortbögen wurden im Anschluss statistisch ausgewertet, die Befragten wurden hierzu den gewählten Gruppen zugeteilt.

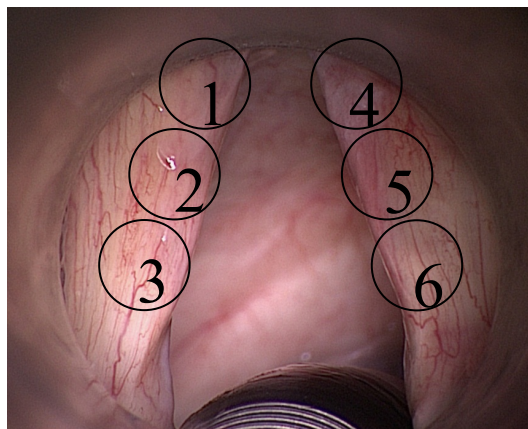


Abb.16: Bildbeispiel aus dem Fragebogen

Markiert sind hier die vorgegebenen Regionen, zu denen die Teilnehmer je nach Einschätzung eine Diagnose stellen sollten.



Für 25 der insgesamt 45 vorgegebenen Regionen lagen histopathologische Befunde vor. Diese Bereiche wurden in Vorbereitung dieser Studie im Rahmen der Mikrolaryngoskopie zunächst fotodokumentiert und markiert. Es wurden auch Verdachtsdiagnosen für Bereiche gestellt, für die kein histopathologischer Befund vorlag. Diese Antworten wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Für die Auswertung wurden die gewählten Verdachtsdiagnosen gemäß der klinischen Verfahrensweisen für die jeweiligen Schweregrade eingeteilt. Kontrollbedürftige Läsionen beinhalteten demnach Veränderungen bis einschließlich der moderaten Dysplasie. Ab einer schweren Dysplasie wurden die Läsionen als behandlungsbedürftig eingeteilt.

Die verwendeten Bilder mit den zugeordneten Regionen sind im Anhang dieser Arbeit zu finden.

### **Statistische Auswertung**

Die statistischen Parameter Sensitivität, Spezifität sowie positiver und negativer prädiktiver Wert wurden aus den gewonnenen Daten für jede Gruppe separat erhoben. Des Weiteren wurde für jede Gruppe der Anteil an über- bzw. unterdiagnostizierten Befunden sowie die Vorhersagegenauigkeit als Anteil aller korrekten Diagnosen errechnet.

Zur Berechnung der statistischen Werte wurden sowohl die Antworten auf die dritte Frage, als auch die Gesamtbeurteilung aus Frage 2 einbezogen. Einschätzungen für Regionen, für die kein histopathologischer Befund vorlag, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Um die Übereinstimmung der Histologie mit der Einschätzung der Teilnehmer darzustellen, wurde für jede Gruppe ein Kappa-Wert berechnet.

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme SPSS 20 (IBM Corp., Armonk, USA) sowie Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, USA) verwendet.

## Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen

Der histopathologischen Untersuchung wurden insgesamt 97 entnommene Proben zugeführt. Diese wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch denselben Pathologen ausgewertet.

An 64 Patienten wurden 97 Gewebebiopsien suspekter und makroskopisch nicht zuordenbarer epithelialer Läsionen der Stimmlippen entnommen. An diesen wurde auch die Untersuchung am konfokalen Mikroskop durchgeführt.

Sieben Patienten zeigten zwei zu untersuchende Befunde auf einer Seite, fünf je einen pro Stimmlippe. Bei drei Patienten wurden zwei suspekte Läsionen auf einer und eine auf der gegenüberliegenden Seite biopsiert, weiteren drei Patienten wurden drei Proben an unterschiedlichen Stellen einer Stimmlippe entnommen. Bei zwei Patienten stellten sich je zwei optisch suspekte Regionen pro Seite dar, so dass bei diesen jeweils vier Gewebeproben untersucht wurden. Beim Vorliegen mehrerer suspekter Läsionen auf einer Stimmlippe wurden diese einzeln entnommen und gesondert untersucht.

In 60 untersuchten Gewebebiopsien wurde die histopathologische Diagnose „low grade SIL“ gestellt. Diese umfasste einfache Hyperplasien, entzündliche Veränderungen, Hyperplasien mit entzündlichen Veränderungen oder mit Atypien. In sechs von diesen Fällen wurde die Diagnose einer geringen Dysplasie gestellt, in zehn Proben fand sich eine moderate Dysplasie.

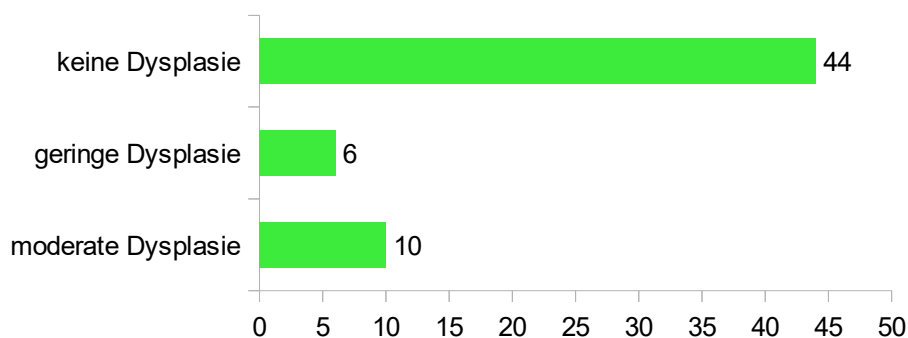


Abb.17: Aufteilung der als low-grade SIL klassifizierten Fälle

Als „high grade SIL“ wurden 37 entnommene Proben klassifiziert. Diese unterteilten sich in zwei hochgradige bzw. schwere Dysplasien, 17 Carcinoma in situ und 18 mikroinvasive Plattenepithelkarzinome.

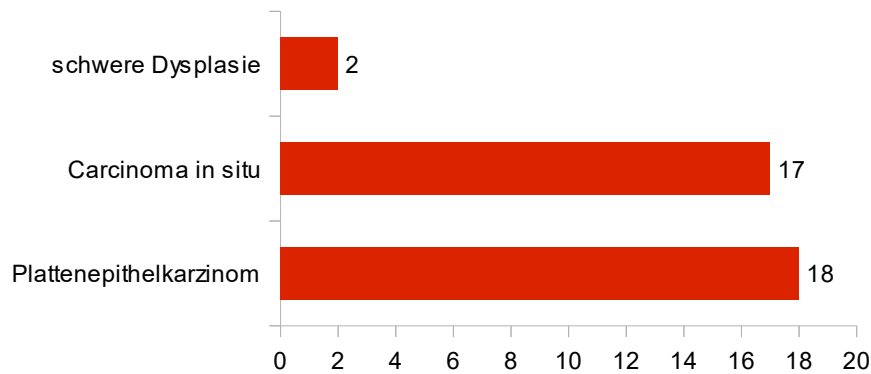


Abb.18: Aufteilung der als high-grade SIL klassifizierten Läsionen

Von dieser Gesamtheit untersuchter Proben wurden in 47 Fällen Untersuchungen sowohl mittels optischer Kohärenztomographie als auch unter dem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Dies entsprach 39 Patienten, die beiden diagnostischen Untersuchungen zugeführt wurden.

Bei drei dieser Patienten wurden zwei sich räumlich getrennt darstellende Läsionen auf der gleichen Stimmlippe untersucht, bei einem Patienten wurde je eine Läsion auf der rechten und der linken Seite begutachtet. Ein Patient zeigte zwei suspekt erscheinende Befunde auf der rechten und einen auf der linken Seite, bei einem weiteren Patienten stellten sich drei zu untersuchende Läsionen auf einer Seite dar.

Zusammenfassend für die 47 Histopathologien wurden 25 histopathologisch als „low grade SIL“ (20 Hyperplasien, vier geringe Dysplasien sowie eine moderate Dysplasie) und 22 als „high grade SIL“ (acht Carcinoma in situ sowie 14 mikroinvasive Plattenepithelkarzinom) eingestuft.

### 3.2 Ergebnisse der Untersuchung mittels konfokaler Mikroskopie

Nach Begutachtung der Proben unter Beachtung der weiter oben genannten Kriterien für die Einteilung der gewonnenen Bilder bzw. Daten mit dem konfokalen Mikroskop wurden 60 Fälle als „low grade SIL“ klassifiziert, in 37 Fällen wurde die Diagnose eines „high grade SIL“ gestellt. Es ergaben sich vier falsch- positive und vier falsch- negative Befunde.

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Histopathologie, die in dieser Studie als Vergleichsstandard herangezogen wurde, ergibt sich somit anhand der in Tabelle 4 aufgeführten Vierfeldertafel für die Konfokale Mikroskopie bei einer Vorhersagegenauigkeit von 92% eine diagnostische Sensitivität von 86% (95%-KI von 70-95%) und eine Spezifität von 92% (95%-KI von 81-97%). Der positive prädiktive Wert liegt bei 86% (95%-KI von 70-95%), der negative prädiktive Wert erreicht 92% (95%-KI von 81-97%).

Als Maß der Übereinstimmung errechnet sich hier ein Kappa von 0,782.

Tab.4: Vierfeldertafel zur CEM-Diagnostik (n=97)

Richtigkeit der CEM-basierten Diagnostik (n=97)			
Histopathologie		CEM	
n		60	37
		low-grade SIL	high-grade SIL
60	low-grade SIL	55	5
37	high-grade SIL	5	32

Tab.5: Statistische Auswertung von Tab.4 mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen

Auswertung der Vierfeldertafel zur CEM-Diagnostik (n=97)		
Sensitivität	86%	95%-KI von 70-95%
Spezifität	92%	95%-KI von 81-97%
PPW	86%	95%-KI von 70-95%
NPW	92%	95%-KI von 81-97%
Vorhersagegenauigkeit	90%	

Von allen 97 untersuchten Fällen wurden, wie weiter oben beschrieben, 47 klinisch suspekte Befunde mit beiden Methoden, d.h. der OCT und der konfokalen Mikroskopie untersucht. Betrachtet man bei diesen 47 Fällen alleine die Ergebnisse, die mit der konfokalen Mikroskopie erbracht wurden, so wurde 25 Mal eine „low grade SIL“ und in 22 Fällen eine „high grade SIL“ diagnostiziert. Hier zeigen sich keine falsch- positiven und drei falsch-negative Ergebnisse. Dementsprechend erhält man eine Sensitivität von 86% (95%-KI von 64-96%), eine Spezifität von 100% (95%-KI von 83-100%), einen positiven prädiktiven Wert von 100% (95%-KI von 79-100%) und einen negativen prädiktiven Wert von 89% (95%-KI von 71-97%). Die Vorhersagegenauigkeit beträgt 94%.

Als Kappa-Wert ergibt sich 0,871.

Diese ergeben sich aus der in Tab. 6 zu findenden Vierfeldertafel.

Tab.6: Vierfeldertafel zur CEM-Diagnostik (n=47)

Richtigkeit der CEM-basierten Diagnostik (n=47)			
Histopathologie		CEM	
n		28	19
		low-grade SIL	high-grade SIL
25	low-grade SIL	25	0
22	high-grade SIL	3	19

Tab.7: Statistische Auswertung von Tab.6 mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen

Auswertung der Vierfeldertafel zur CEM-Diagnostik (n=47)		
Sensitivität	86%	95%-KI von 64-96%
Spezifität	100%	95%-KI von 83-100%
PPW	100%	95%-KI von 79-100%
NPW	89%	95%-KI von 71-97%
Vorhersagegenauigkeit	94%	

### 3.3 Ergebnisse der Untersuchung mittels optischer Kohärenztomographie

Die gespeicherten Bild- bzw. Videodaten wurden anhand der Epitheldicke den beschriebenen zwei Möglichkeiten zugeteilt. 20 Fälle wurden als „low grade SIL“, 27 als „high grade SIL“ klassifiziert. Somit wurden, verglichen mit der Histopathologie, mit der OCT fünf falsch-positive und keine falsch-negativen Befunde erstellt. Für die Sensitivität kommt so ein Wert von 100% (95%-KI von 80-100%) zustande, die Spezifität ergibt 80% (95%-KI von 59-92%), der positive prädiktive Wert liegt bei 81% (95%-KI von 61-93%), der negative prädiktive Wert bei 100% (95%-KI von 80-100%). Die Vorhersagegenauigkeit liegt bei 89%, es lässt sich ein Kappa-Wert von 0,789 errechnen.

Tab.8: Vierfeldertafel zur OCT-Diagnostik (n=47)

Richtigkeit der OCT-basierten Diagnostik (n=47)			
Histopathologie		OCT	
n		20	27
		low-grade SIL	high-grade SIL
25	low-grade SIL	20	5
22	high-grade SIL	0	22

Tab.9: Statistische Auswertung von Tab.8 mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen

Auswertung der Vierfeldertafel zur OCT-Diagnostik (n=47)		
Sensitivität	100%	95%-KI von 82-100%
Spezifität	80%	95%-KI von 59-92%
PPW	81%	95%-KI von 61-93%
NPW	100%	95%-KI von 80-100%
Vorhersagegenauigkeit	89%	

Die gemessenen maximalen Epitheldicken variierten zwischen 81  $\mu\text{m}$  und 444  $\mu\text{m}$ . Den jeweiligen histopathologischen Befunden zugeordnet sind die gemessenen Dicken der Epithelschicht in nachfolgender Grafik ersichtlich. Da beim Vorhandensein verschiedener dysplastischer Schweregrade der höchste angenommen wurde, existiert in den 47 Fällen nur eine moderate Dysplasie (81  $\mu\text{m}$ ) und keine schwere Dysplasie.

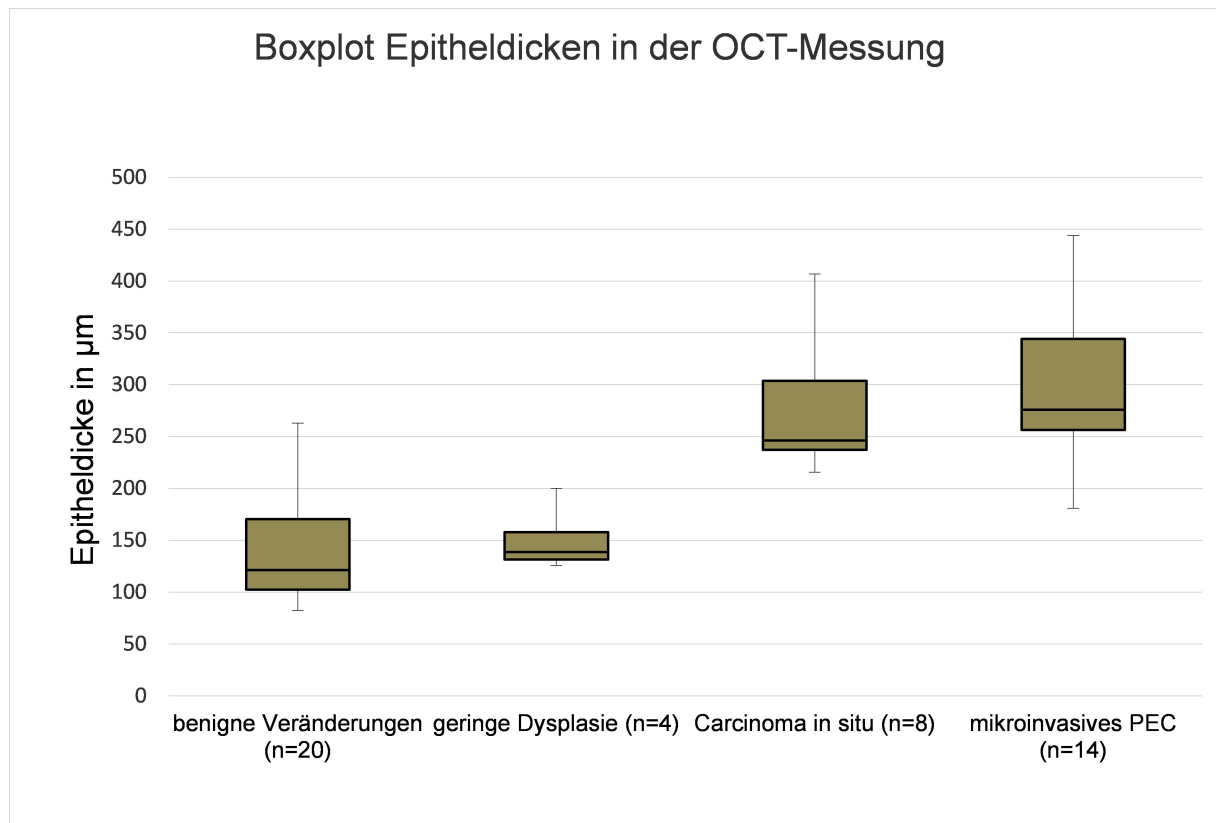


Abb.19: Boxplot der mittels OCT gemessenen Epitheldicken in Bezug auf den histopathologischen Befund. Die einzige moderate Dysplasie (81  $\mu\text{m}$  gemessen) ist nicht abgebildet. Unter den 47 einbezogenen Läsionen fand sich keine schwere Dysplasie.

### 3.4 Kombination der Untersuchungsmethoden

Da in den beschriebenen 47 Fällen ein diagnostisches Ergebnis aus beiden Untersuchungsmethoden vorliegt, lassen sich diese beiden Methoden hier nebeneinander stellen und kombinieren (siehe Tab. 10).

So lässt sich im Zusammenspiel beider Methoden jeder Befund, der entweder in der OCT oder der konfokalen Mikroskopie oder in beiden als positiv bzw. „high grade SIL“ bewertet wurde, als positiv ansehen. Negativ sind hingegen nur die Befunde, die in beiden Methoden als „low grade SIL“ bzw. negativ klassifiziert wurden. Bei fünf falsch-positiven und keinen falsch-negativen Befunden erreicht man als Sensitivität 100% (95%-KI von 82-100%), die Spezifität erreicht 80% (95%-KI von 59-92%). Der positive und negative prädiktive Wert liegt bei 81% (95%-KI von 61-93%) bzw. 100% (95%-KI von 80-100%). Die Vorhersagegenauigkeit erreicht 89%. Der Kappa-Wert beträgt 0,789.

Dies entspricht exakt den statistischen Werten der reinen OCT-Diagnostik. Einer der falsch-negativen Befunde aus der CEM-Auswertung wird in der Kombination der Methoden korrigiert, jedoch bleiben die fünf falsch positiven Befunde mittels der OCT weiterhin bestehen.

Tab.10: Vierfeldertafel zur Kombination von CEM- und OCT-basierter Diagnostik (n=47)

Richtigkeit der kombinierten CEM- und OCT-basierten Diagnostik (n=47)			
Histopathologie		CEM+OCT	
n		20	27
		low-grade SIL	high-grade SIL
25	low-grade SIL	20	5
22	high-grade SIL	0	22



Tab.11: Statistische Auswertung von Tab.10 mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen

Auswertung der Vierfeldertafel zur kombinierten CEM-und OCT-Diagnostik (n=47)		
Sensitivität	100%	95%-KI von 82-100%
Spezifität	80%	95%-KI von 59-92%
PPW	81%	95%-KI von 61-93%
NPW	100%	95%-KI von 80-100%
Vorhersagegenauigkeit	89%	

### 3.5 Patientenbeispiele

In beiden Methoden wurde versucht, die verschiedenen Veränderungen des Stimmlippenepithels entsprechend zu klassifizieren. Während die konfokale Mikroskopie eine Zuordnung auf Basis der zellulären Veränderungen im Bild ermöglichte, erfolgte die Diagnosestellung im Rahmen der OCT anhand der Epitheldicke. Die gemessenen Werte sind anhand der tatsächlichen histopathologischen Befunde in Abb. 19 dargestellt. Im Anschluss sind Beispiele verschiedener Veränderungen mit den entsprechenden Bilddaten aufgeführt.

#### Benigne Veränderungen

Benigne Veränderungen wie beispielsweise Hyperplasien zeigten in der optischen Biopsie mittels OCT sowie der konfokalen Mikroskopie nur selten Anzeichen dysplastischer Vorgänge. Der makroskopische Befund hingegen ließ die Zuordnung zu einer Hyperplasie bzw. auch einer Hyperplasie mit Entzündung nicht immer zu. Abb. 20 steht hier exemplarisch für den Befund einer Hyperplasie.

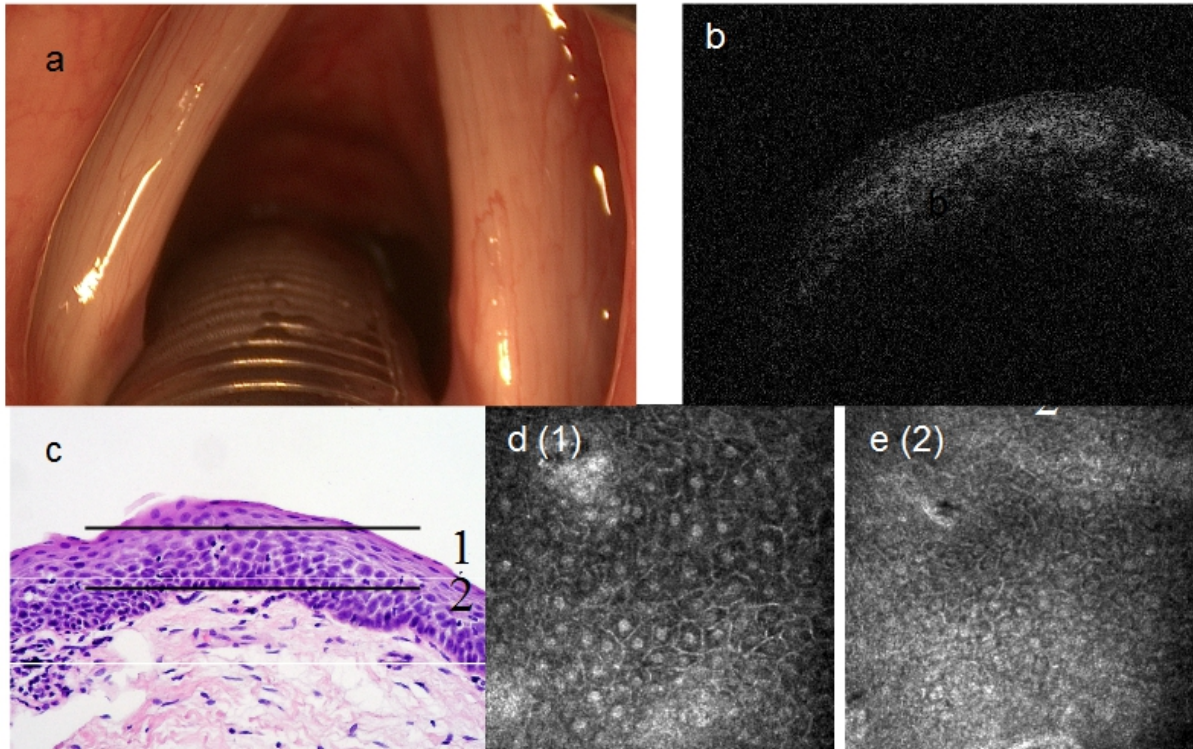


Abb.20: (a) Makroskopischer Befund: klinisch suspekt zeigte sich dass hintere rechte Stimmlippendrittel (b) OCT-Scan: Die Epitheldickenmessung zeigte eine maximale Dicke von 103µm (c) histologischer Schnitt: Es zeigten sich keine Atypien. Die Linien zeigen die Höhen der unter d und e dargestellten CEM-Aufnahmen. (d)/(e): CEM-Aufnahmen: In beiden Ebenen erhaltene Zellgrenzen. Es konnten keine Zell- oder Kernatypien dargestellt werden.

Die OCT erbrachte in der Messung Epitheldicken der 20 benignen Läsionen zwischen 73 und 234 µm bei einem Mittelwert von 129,8 µm. Die Schichtung des Gewebes und die Integrität der Basalmembran ließen sich fast immer deutlich erkennen.

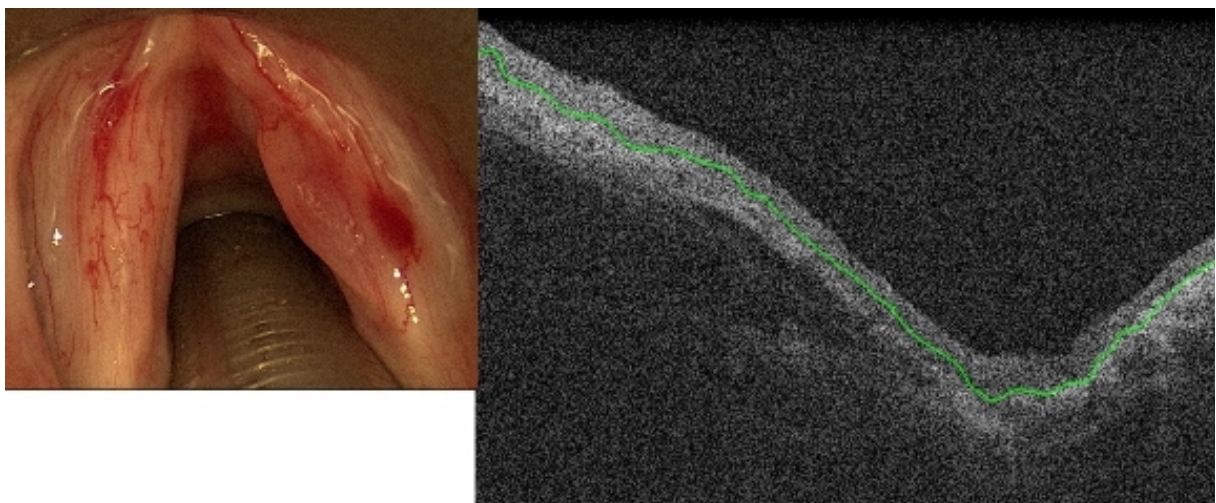


Abb.21: Histopathologisch zeigte der Befund der rechten Stimmlippe eine Hyperplasie ohne Dysplasien sowie ein leichtes Reinke-Ödem. In den OCT-Bildern konnte eine Basalmembran im gesamten Verlauf dargestellt werden (grüne Linie). Eine Epitheldicke von 150,1 µm wurde errechnet und die Veränderung konnte korrekt zugeordnet werden.

Im CEM-Bild waren keine Anzeichen für Dysplasien zu erkennen. Teilweise ließ sich eine erhöhte Zellzahl in den tieferen Schichten erkennen. Vielmehr fanden sich aber regelhafte Zellen im Zellverband.

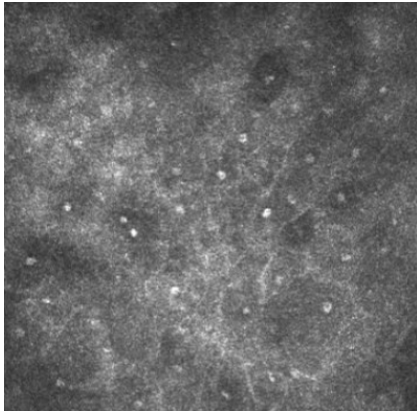


Abb.22: In der konfokalmikroskopischen Untersuchung zeigt sich eine regelhafte Zellarchitektur mit sichtbaren Zellgrenzen ohne Anzeichen für Atypien.

### Geringe Dysplasie

Auch geringe bzw. milde Dysplasien zeigten ein variables makroskopisches Bild.

Die OCT erbrachte meist eine klar definierte Schichtung des Gewebes mit guter Messbarkeit der Epitheldicke. Diese betrug zwischen 126 und 200  $\mu\text{m}$  mit einem Mittelwert von 151  $\mu\text{m}$ . Nur einmal zeigte sich aufgrund der begleitenden Entzündung des Gewebes eine starke Vergrößerung, die diesen Patienten falsch- positiv zur Gruppe der „high grade SIL“ zählen ließ.



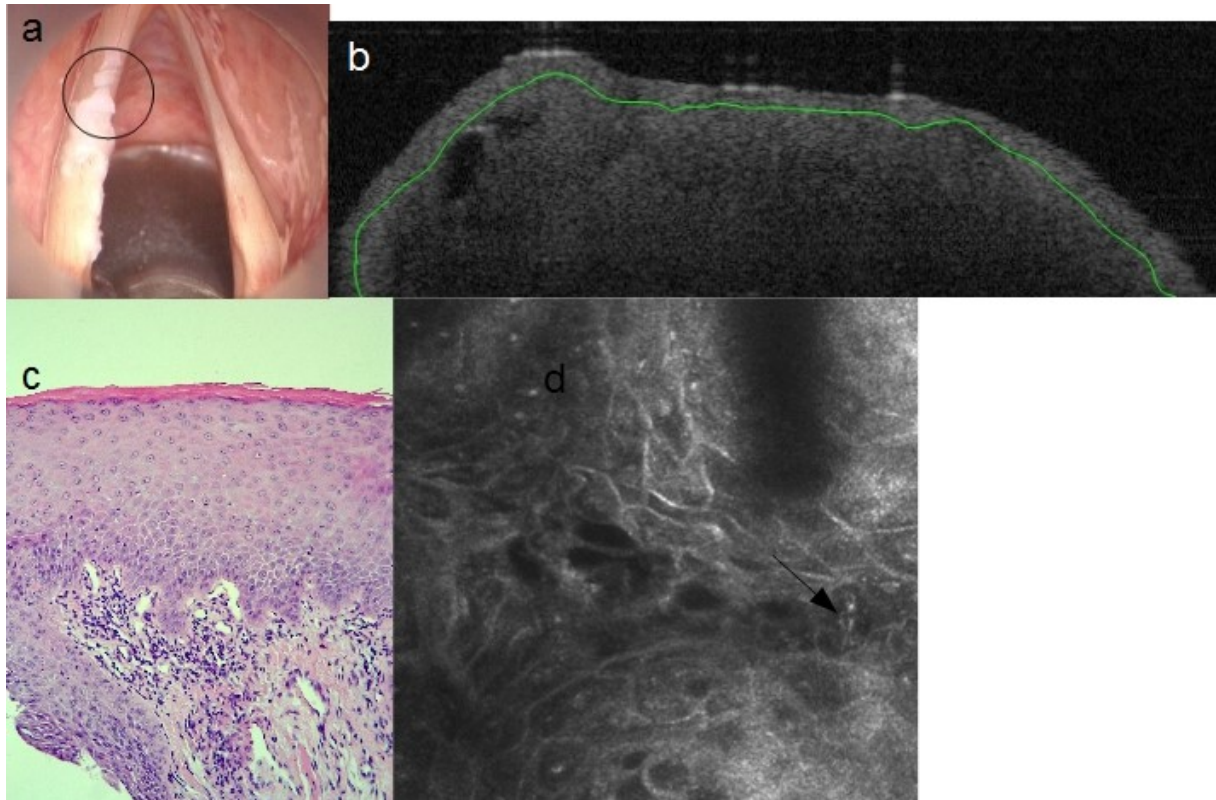


Abb.23: (a) Makroskopischer Befund: OCT-Scan und konfokalmikroskopische Untersuchung erfolgten in der mit einem Kreis markierten Region (b) Die OCT-Tiefenmessung ergab eine maximale Epitheldicke von 126  $\mu\text{m}$  bei durchgehend verfolgbare Basalmembran (grüne Linie) und somit die korrekte Zuordnung als low-grade SIL. (c) histologischer Schnitt: Es wurde eine geringgradige Dysplasie festgestellt. (d): CEM-Aufnahmen: Es wurden vereinzelt Zelltypen in den tiefen Schichten erfasst. Beispielhaft hier eine binukleäre Zelle mit Pfeil markiert. Es zeigt sich eine hohe Zellvariabilität, eine reguläre Schichtung ist teilweise aufgehoben.

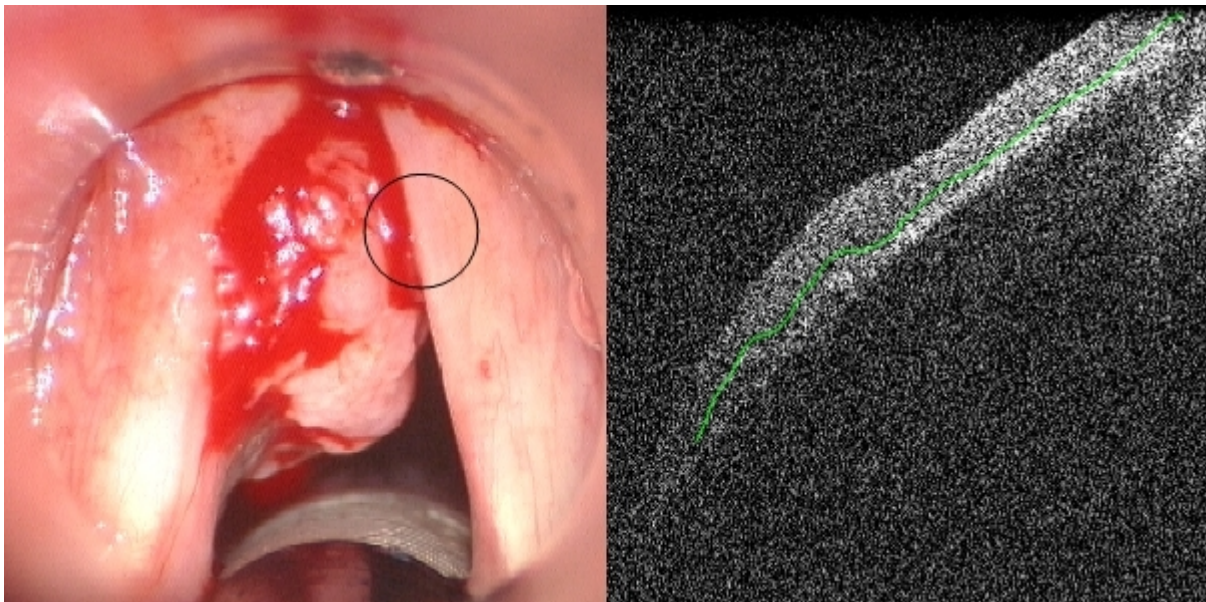


Abb.24: Es zeigte sich makroskopisch eine ausgedehnte Läsion der linken Stimmlippe, die sich histopathologisch als Plattenepithelkarzinom darstellte und in der OCT-Messung eine maximale Dicke von 325,8  $\mu\text{m}$  erbrachte. Eine zusätzliche Untersuchung der Gegenseite (schwarzer Kreis) erbrachte eine gemessene Epitheldicke von 81  $\mu\text{m}$  bei intakter Basalmembran (grüne Linie). Die hier entnommene Probe wurde durch den Pathologen als moderate Dysplasie klassifiziert und somit in der OCT korrekt als low-grade klassifiziert.

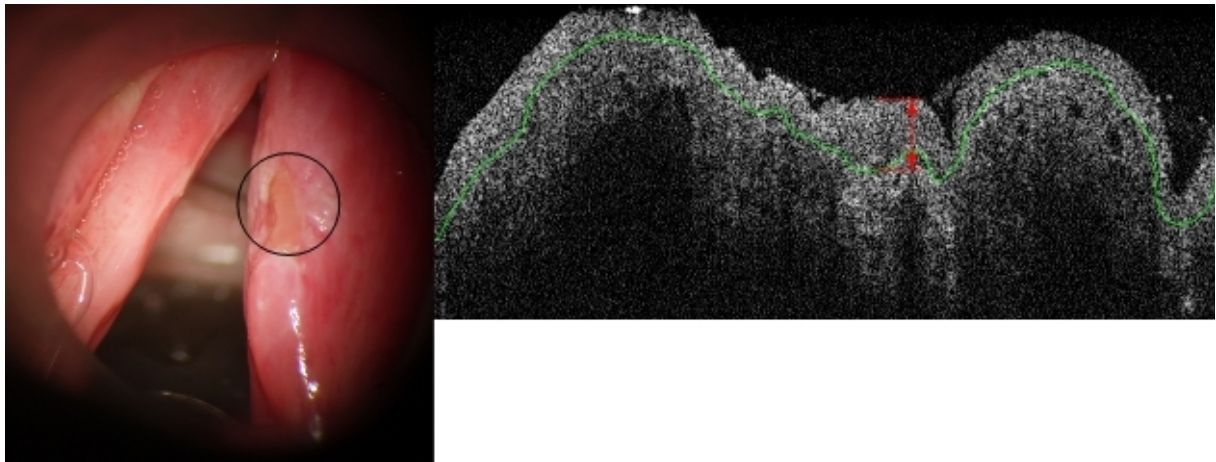


Abb.25: Die makroskopisch sichtbare Läsion wurde histopathologisch als Hyperplasie mit Entzündung klassifiziert, es fanden sich keine Dysplasien. Im OCT-Scan präsentierte sich eine intakte Basalmembran (grüne Linie), in der Tiefenmessung wurde jedoch eine Epitheldicke von 200 µm errechnet (roter Pfeil). Daher wurde dieser Fall falsch-positiv als high-grade SIL bewertet.

In der CEM fanden sich in den tieferen Ebenen des Gewebes dysplastische Zellen und Störungen der Zellarchitektur wie in Abb.23 dargestellt, die auf die entsprechende Diagnose schließen ließen.

### **Schwere Dysplasie**

Die Diagnose einer schweren Dysplasie des Epithels der Stimmlippe wird gemäß der WHO beim Vorliegen schwerwiegender Zeichen dysplastischer Vorgänge gestellt, wenn diese mehr als die unteren zwei Drittels der Epithelschicht betreffen. Der Übergang zum Carcinoma in situ stellt sich hierbei in der Realität fließend dar, da zumeist auch weitere Anzeichen zu finden sind, die auf eine Ausbreitung der Dysplasie über nahezu die gesamte Epitheldicke schließen lassen. In der hier vorliegenden Studie der mit beiden Verfahren untersuchten Patienten fand sich daher kein Fall, bei dem histopathologisch eine schwere Dysplasie als Diagnose gestellt wurde.

### **Carcinoma in situ**

Makroskopisch sehr verschieden imponierend, stellten sich diese Befunde auch in der Epitheldicke im OCT variabel dar. Die gemessenen Werte der acht histopathologisch verifizierten Fälle variierten zwischen 216 und 407 µm mit einem Mittelwert von 275,5 µm.



Teilweise wurde das Auffinden der Basalmembran durch Streuungsartefakte des dysplastischen Gewebes erschwert. Insgesamt zeigte sich meist aber doch eine Integrität der Basalmembran.

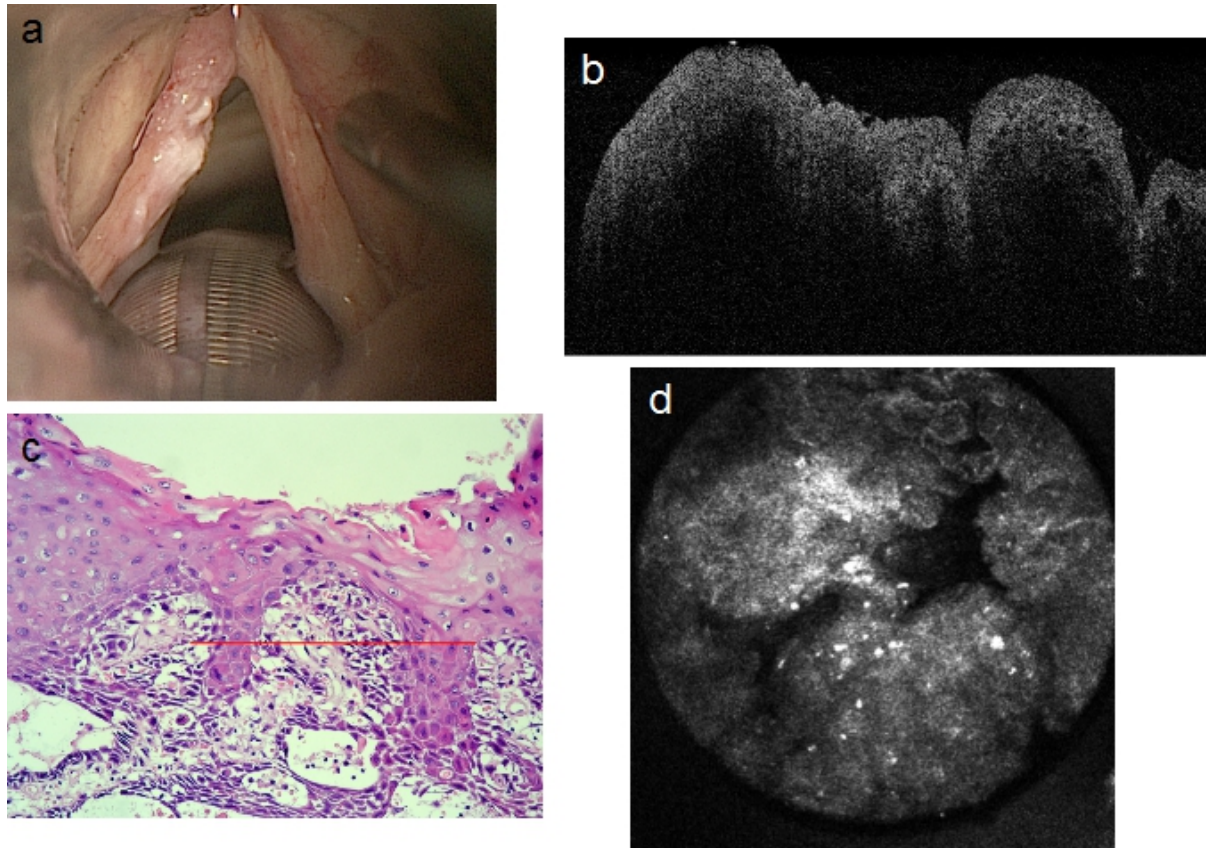


Abb. 26: (a) Makroskopischer Befund (b) OCT-Scan: Es ergab sich eine maximale Epitheldicke von 234 µm, ein Integritätsverlust der Basalmembran konnte nicht dargestellt werden. (c) histologischer Schnitt: Die rote Linie markiert die Höhe des nachfolgenden CEM-Bilds. (d) CEM-Aufnahme: Es zeigen sich verschieden große Zellen und Zellkerne, Zellgrenzen im Zellverband sind nicht mehr abgrenzbar.

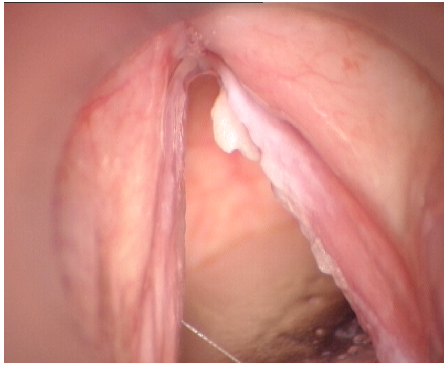


Abb.27: Der Befund erstreckt sich entlang der rechten Stimmlippe, aufgenommen während der Mikrolaryngoskopie.

Histopathologisch ergab sich ein Carcinoma in situ.

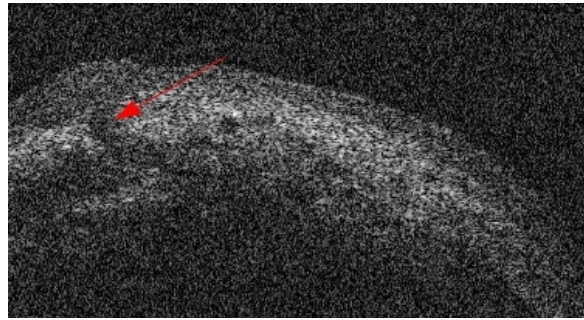


Abb.28: In den OCT-Daten dieses Patienten zeigte sich auch der Verdacht auf eine Diskontinuität der basalen Zellschicht (roter Pfeil), der sich histopathologisch jedoch nicht bestätigen ließ.

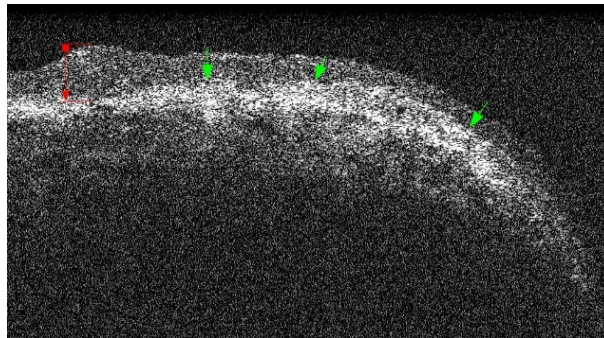


Abb.29: Im OCT-Scan ist eine klare Schichtung des Gewebes mit einer abgrenzbaren Basalmembran erkennbar (grüne Pfeile). Das Epithel zeigt in der linken Bildhälfte eine Größenzunahme. Die Messung der Epitheldicke wurde am Ort der größten Ausdehnung durchgeführt und ergab 216  $\mu\text{m}$  (roter Pfeil).



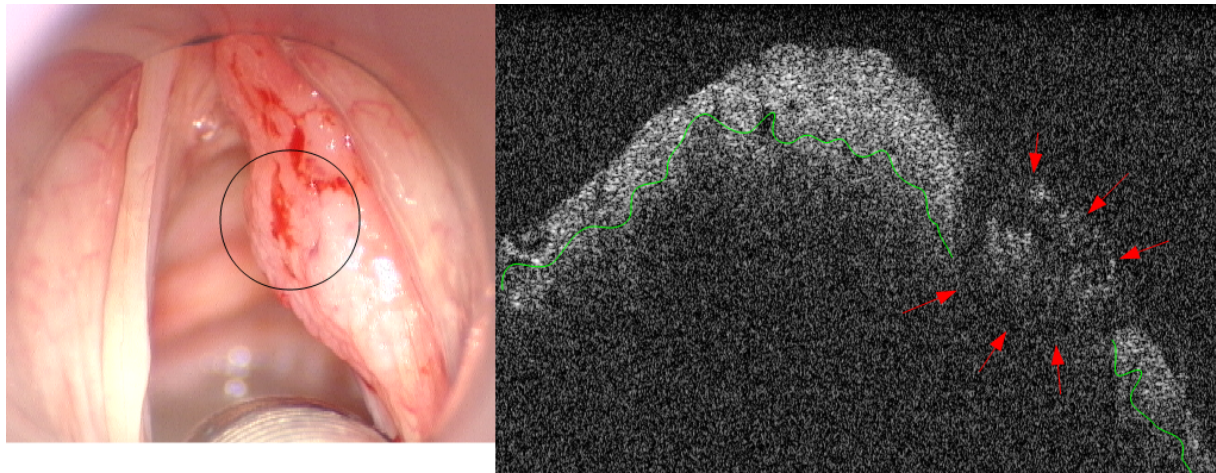


Abb.30: Histopathologisch lag ein Carcinoma in situ vor. In der OCT-Untersuchung wurde eine maximale Epitheldicke von 275  $\mu\text{m}$  gemessen. In dem mit roten Pfeilen markierten Bereich liegt der Verdacht einer dysplastischen Veränderung nahe, basal zeigt sich aber noch eine Abgrenzung zum tieferen Gewebe.

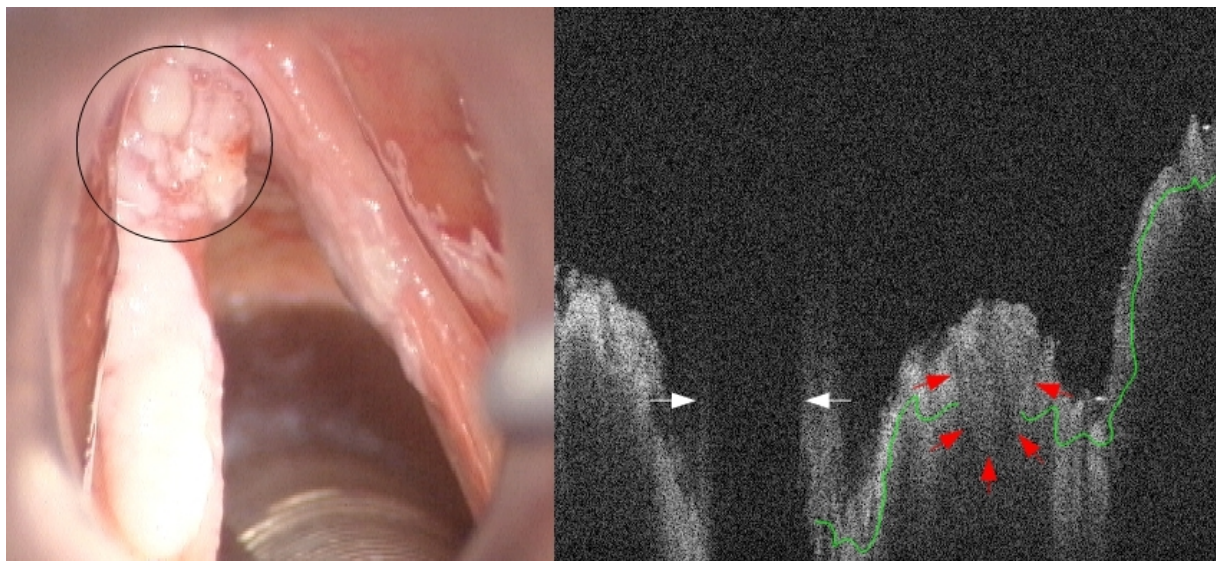


Abb.31: Makroskopisch sichtbar ist ein suspekter Befund im vorderen Bereich der linken Stimmlippe sowie eine Leukoplakie im mittleren bis hinteren Drittel. Im OCT-Bild lässt sich im vorderen Bereich eine Basalmembran teilweise abgrenzen (grüne Linie). Die roten Pfeile markieren einen fraglichen Durchbruch der basalen Zellschicht bzw. den Ort der maximalen Epitheldicke. Ausgemessen wurden hier 406,6  $\mu\text{m}$ . Histopathologisch zeigte sich kein Überschreiten der Basalmembran und somit ein Carcinoma in situ. Die zerklüftete Oberfläche wirkte sich auf die Qualität der OCT-Daten aus. Teilweise konnten aufgrund der Höhenunterschiede Bereiche nicht abgebildet werden (weiße Pfeile).

Die Untersuchung am konfokalen Mikroskop erbrachte Zellatypien, welche bis zur Oberfläche reichten.



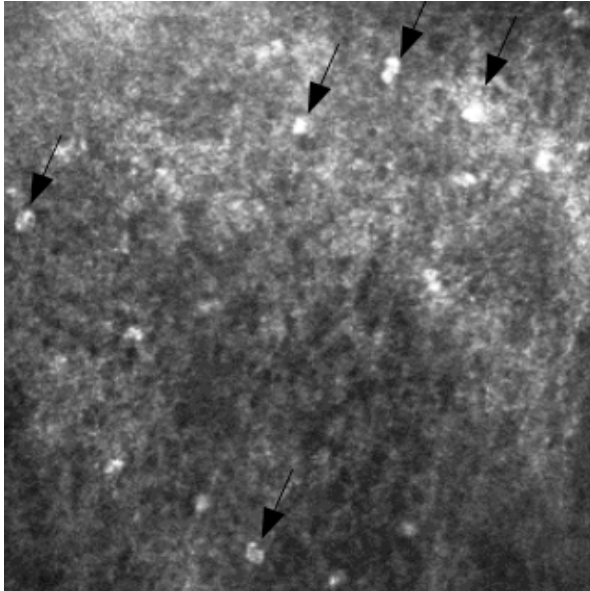


Abb.32: Konfokalmikroskopische Aufnahme eines Carcinoma in situ. Durch das gesamte Epithel fanden sich atypische Zellen wie die hier exemplarisch markierten vergrößerten und atypisch verformten Zellkerne. Zellgrenzen im Zellverband sind nur noch vereinzelt abgrenzbar.

### **Mikroinvasives PEC**

Patienten, bei denen ein mikroinvasives Plattenepithelkarzinom vorlag, stellten sich in beiden Untersuchungsmethoden meist deutlich dysplastisch dar, obwohl der makroskopische Befund dies nicht eindeutig nahe legte.

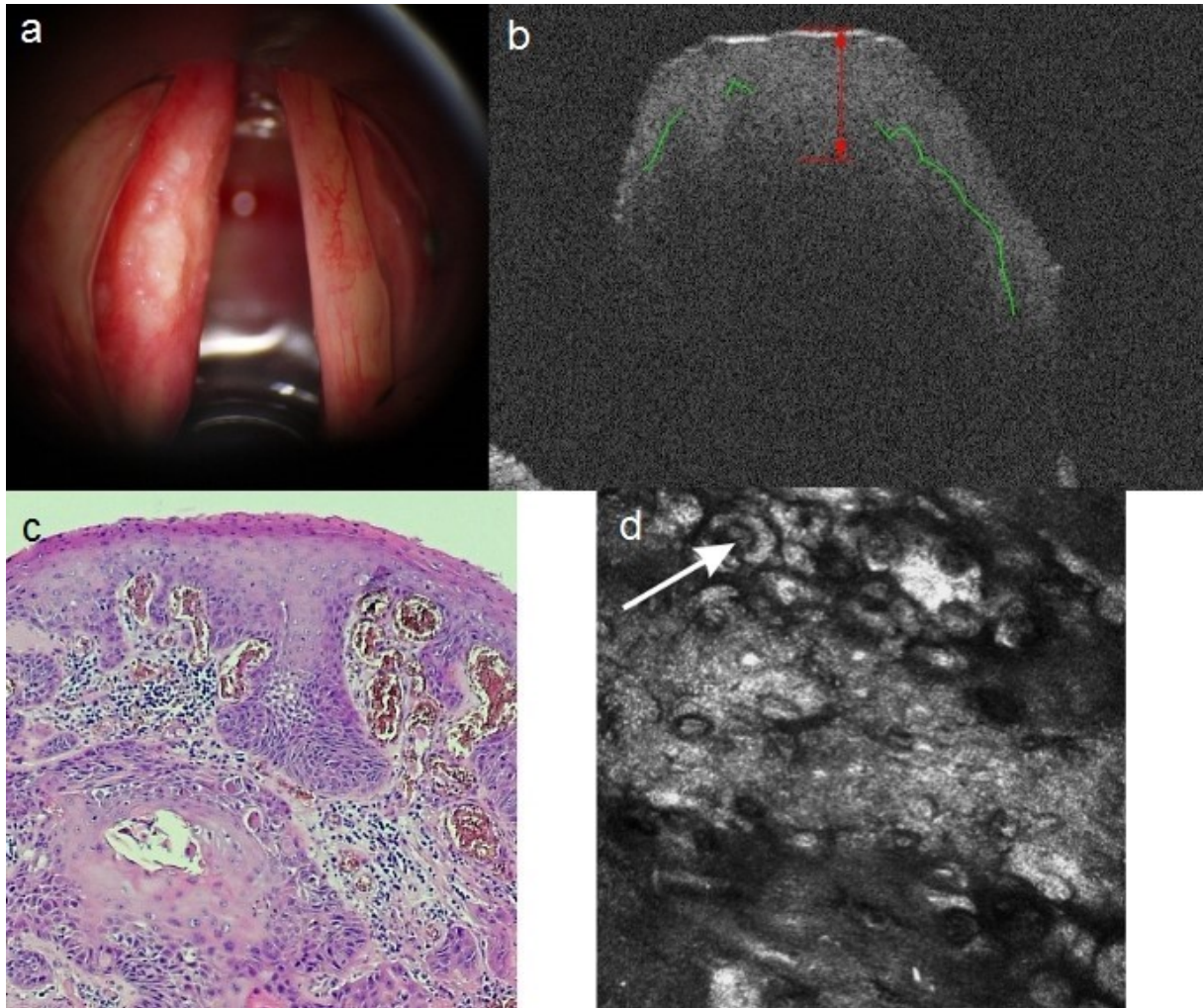


Abb.33: (a) Makroskopischer Befund: Die nachfolgenden Bilder entstammen der linken Stimmlippe. (b) OCT-Scan: Die basale Zellschicht zeigt sich mehrfach im Verlauf unterbrochen (grüne Linien), die maximale Epitheldicke misst 275  $\mu\text{m}$ . (c) histologischer Schnitt: Der ausgedehnte Befund stellte sich als mikroinvasives Plattenepithelkarzinom dar. Es zeigt sich ein in die Tiefe reichender Zapfen atypischer Epithelproliferationen zentral. (d) CEM-Aufnahme: Hier zeigen sich mehrere Malignitätskriterien. Der weiße Pfeil markiert eine dysplastische Zelle mit deutlich vergrößertem Zellkern. Man findet Zellcluster und eine Erhöhung der Zellkern-Zytoplasma-Ratio. Zellmembranen stellen sich nicht mehr dar.

Mit der OCT- Technik konnte hier nicht immer eine eindeutige epitheliale Basalmembran dargestellt werden. Vielmehr imponierte eine deutliche Vergrößerung der Epithelschicht, wie in Abb.30 zu sehen ist. Die in den gewonnenen Bilddaten gemessenen Schichtdicken bei den Patienten mit einem mikroinvasiven Plattenepithelkarzinom variierten in einem Bereich von 181 und 444  $\mu\text{m}$  um einen Mittelwert von 302,5  $\mu\text{m}$ .

Die gute Zuordnung der OCT- Bilder dieser Patienten zeigt sich deutlich beim Vergleich des Befundes mit der gegenüberliegenden gesunden Seite. Wie in Abb. 35 ersichtlich, ist auf der gesunden Seite eine klar erkennbare Schichtung mit deutlich abgrenzbarer Basalmembran erkennbar, wohingegen am Ort des mikroinvasiven Plattenepithelkarzinoms diese Schichtung

nicht mehr auszumachen ist (siehe Abb. 36). Hier lässt sich eine Epithelschicht von 275  $\mu\text{m}$  Dicke ausmessen, sowie ein Überschreiten bzw. Durchbrechen der Basalmembran erkennen.

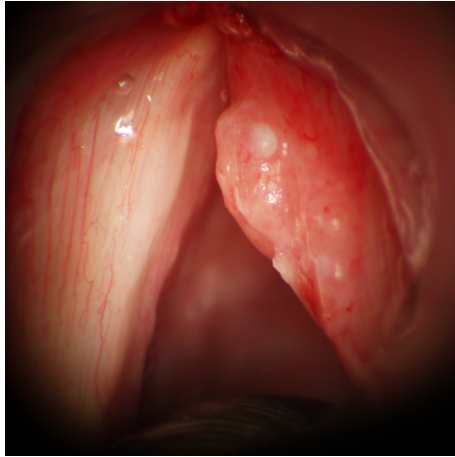


Abb.34: Histopathologisch als Plattenepithelkarzinom diagnostizierte Läsion an der rechten Stimmlippe.

Vergleichend wurde ein OCT-Scan der gesunden Gegenseite durchgeführt (siehe Abb.33).

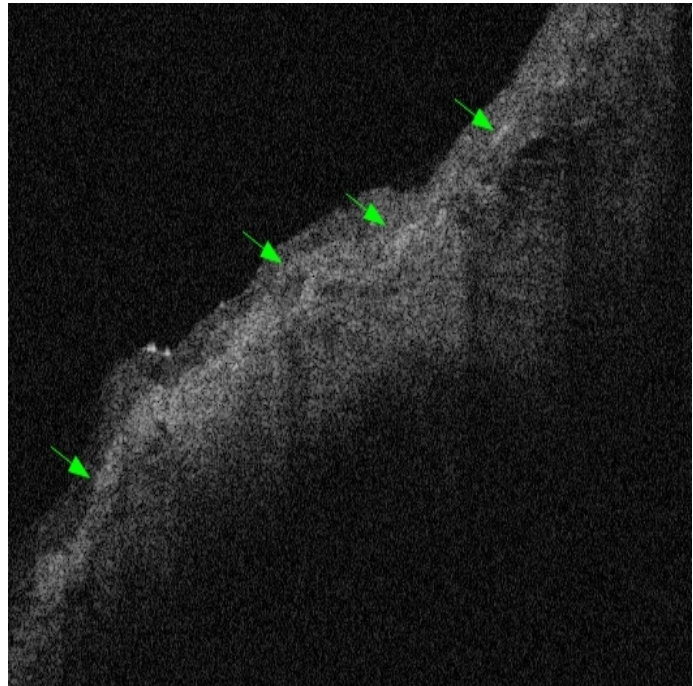


Abb.35: Scan durch die gesunde linke Stimmlippe. Es zeigt sich eine durchgehend erhaltene Schichtung des Epithels mit erkennbarer Basalmembran (grüne Pfeile).

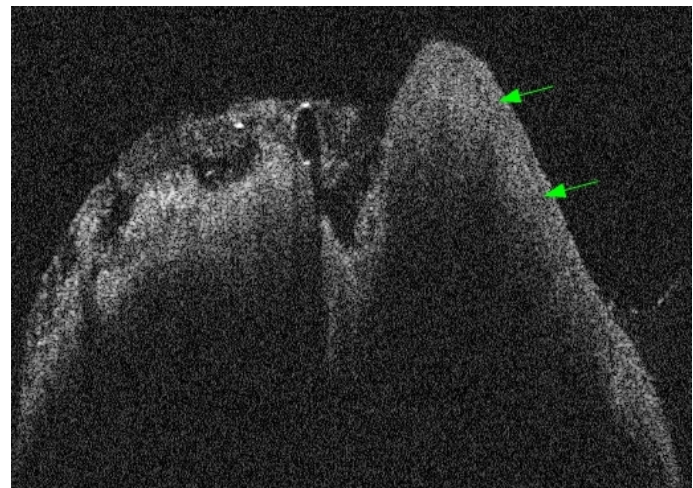


Abb.36: Scan durch die rechte Stimmlippe. Im rechten Bereich findet sich noch eine erhaltene Schichtung (grüner Pfeil), zum Innenrand der Stimmlippe zeigt sich hingegen ein sichtbarer Verlust der Epithelschichtung bei deutlicher Größenzunahme, eine Abgrenzung zum subepithelialen Bereich ist nur bedingt möglich. Die Tiefenmessung erbrachte einen Maximalwert von 275 $\mu\text{m}$ . Histopathologisch bestätigte sich der Verdacht auf ein invasives Plattenepithelkarzinom.

Das konfokale Mikroskop erbrachte bei diesen Patienten meist deutliche Zeichen dysplastischer Vorgänge. Diese waren nicht auf einzelne Schichten begrenzt, sondern zeigten sowohl oberflächlich als auch in der Tiefe der untersuchten Gewebeproben.

Abb. 37 steht exemplarisch für die aufgenommenen Einzelbilder bei Patienten mit mikroinvasivem Plattenepithelkarzinom.

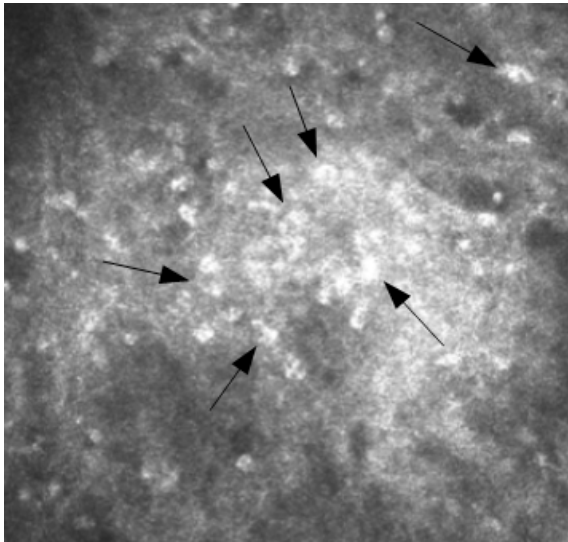


Abb.37: In der Aufnahme zeigen sich deutlich vergrößerte Zellen bzw. Zellkerne, in den weiteren Schnittbildern lässt sich die hier als zentrale Aufhellung erkennbare Anhäufung von atypischen Zellen weiterverfolgen. Zellgrenzen lassen sich nur bedingt erkennen. Die histopathologische Diagnose eines mikroinvasiven Karzinoms bestätigte den Verdacht aus der Untersuchung mit der konfokalen Mikroskopie.

### 3.6 Auswertung der Pilotstudie

22 Personen haben den Fragebogen bearbeitet und die Antwortbögen vollständig ausgefüllt. In der Gruppe der erfahrenen Kehlkopfchirurgen nahmen fünf Personen teil, sechs HNO-Ärzte und Assistenzärzte mit wenig Erfahrung in der Kehlkopfchirurgie bildeten die zweite Gruppe, elf klinisch Unerfahrene bildeten die dritte.

Nachfolgend ist für jede der drei Gruppen die entsprechende Vierfeldertafel dargestellt. Des Weiteren ist die jeweilige Auswertung von Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert, Vorhersagegenauigkeit sowie der Anteil der unter- bzw. überdiagnostizierten Befunde aufgeführt.

Die Auswertung der Ergebnisse der erfahrenen Kehlkopfchirurgen ergab für Sensitivität und Spezifität Werte von 85% (95% KI von 71-93%) und 56% (95% KI von 46-65%), positiver und negativer prädiktiver Wert betrugen 44% (95% KI von 34-52%) bzw. 90% (95% KI von 80-96%). Die Vorhersagegenauigkeit lag bei 65%, der Kappa-Wert war 0,325 ( $p < 0,0005$ ).

Tab.12: Auswertung der Antworten der erfahrenen Kehlkopfchirurgen

Die erste Gruppe, bestehend aus fünf erfahrenen Kehlkopfchirurgen der Universitätsklinik, bewertete insgesamt 161 Läsionen der Läsionen.

Ergebnisse der Gruppe der erfahrenen Kehlkopfchirurgen (n=161)			
Histopathologie		Gruppe 1	
n		71	90
		kontrollbedürftig	behandlungsbedürftig
114	kontrollbedürftig	64	50
47	behandlungsbedürftig	7	40



Tab.13: Auswertung der Antworten der erfahrenen Kehlkopfchirurgen (10 und mehr kehlkopfchirurgische Operationen pro Jahr)

Auswertung der Vierfeldertafel der erfahrenen Kehlkopfchirurgen			
Sensitivität	85%		
Spezifität	56%	Unterdiagnostiziert	4%
PPW	44%	Überdiagnostiziert	31%
NPW	90%		
Vorhersagegenauigkeit	65%		

Die zweite Gruppe, bestehend aus HNO-Ärzten mit wenig kehlkopfchirurgischer Erfahrung, zeigte eine Sensitivität von 68% (95% KI von 54-79%) sowie eine Spezifität von 61% (95% KI von 51-70%). Der positive bzw. negative prädiktive Wert lag bei 48% (95% KI von 37-59%) bzw. 78% (95% KI von 68-86%), die Vorhersagegenauigkeit betrug 63%. Der Kappa-Wert betrug 0,262 ( $p < 0,0005$ ).

Tab.14: Vierfeldertafel der Ärzte mit wenig kehlkopfchirurgischer Erfahrung

Zur Gruppe 2 zugehörig waren sechs HNO-Ärzte und Assistenzärzte der Rostocker HNO-Klinik, die an dieser Studie teilgenommen haben. Insgesamt ergaben sich somit 172 Befunde, die in die Auswertung einbezogen werden konnten.

Ergebnisse der Gruppe der Ärzte mit wenig Erfahrung in der Kehlkopfchirurgie (n=172)			
Histopathologie		Gruppe 2	
n		88	84
		kontrollbedürftig	behandlungsbedürftig
113	kontrollbedürftig	69	44
59	behandlungsbedürftig	19	40

Tab.15: Auswertung der Antworten der Ärzte mit wenig Erfahrung in der Kehlkopfchirurgie

Auswertung der Vierfeldertafel der HNO-Ärzte mit wenig kehlkopfchirurgischer Erfahrung			
Sensitivität	68%		
Spezifität	61%	Unterdiagnostiziert	11%
PPW	48%	Überdiagnostiziert	26%
NPW	78%		
Vorhersagegenauigkeit	63%		

Die statistische Auswertung in der Gruppe der klinisch Unerfahrenen ergab eine Sensitivität von 68% (95% KI von 39-58%), eine Spezifität von 61% (95% KI von 55-67%), positiver und negativer prädiktiver Wert betrugen 39% (95% KI von 31-47%) und 70% (95% KI von 63-76%), die Vorhersagegenauigkeit lag bei 63%.

Tab.16: Vierfeldertafel der klinisch Unerfahrenen

Der Anteil richtiger Antworten liegt hier bei 67% und damit knapp über der Hälfte. Aus den Antwortbögen der elf Teilnehmer aus dieser Gruppe ergab sich eine Anzahl von 354 beurteilten Läsionen, zu denen eine Histopathologie vorlag.

Ergebnisse der Gruppe der klinisch Unerfahrenen (n=354)			
Histopathologie		Gruppe 3	
n		205	149
		kontrollbedürftig	behandlungsbedürftig
234	kontrollbedürftig	143	91
120	behandlungsbedürftig	62	58

Tab.17: Auswertung der Antworten der Gruppe der klinisch Unerfahrenen

Auswertung der Vierfeldertafel der klinisch Unerfahrenen			
Sensitivität	48%		
Spezifität	61%	Unterdiagnostiziert	18%
PPW	39%	Überdiagnostiziert	26%
NPW	70%		
Vorhersagegenauigkeit	57%		

Die erste Frage beschäftigte sich mit der Art der histologischen Sicherung des jeweiligen Bildbefunds.

Tab.18: Darstellung der Antworten zur Frage der histologischen Sicherung des Befunds im Vergleich zur klinischen Erfahrung

Ergebnisse der Frage zur histologischen Sicherung des Befunds			
Gruppe	Antwort		
	Exzision der gesamten Läsion	Probenentnahme	subepitheliale Chordektomie
erfahrene Kehlkopfchirurgen	7	32	1
HNO-Ärzte mit wenig Erfahrung	6	64	6
klinisch Unerfahrene	16	55	16

Die erfahrenen Chirurgen entschieden sich in 80% der Fälle für eine Probenentnahme, nur in einem Fall (2,5%) wurde eine subepitheliale Chordektomie angestrebt. In dieser Gruppe zeigt sich auch die größte Übereinstimmung zur Vorgehensweise je vorgelegtem Bildbefund.

In der Gruppe der weniger erfahrenen HNO-Ärzte wurde in jeweils 8% der Fälle eine Exzision der gesamten Läsion bzw. eine subepitheliale Chordektomie zur Sicherung vorgeschlagen, mit einem Anteil von 84% liegt die Tendenz zur Probenentnahme auf einem nur gering höheren Niveau als bei den erfahrenen Kehlkopfchirurgen.

Mit jeweils 18% entschieden sich die klinisch Unerfahrenen für die Exzision der gesamten Läsion bzw. für eine subepitheliale Chordektomie. Zur Probenentnahme tendierte diese Gruppe in 64% der Fälle, allerdings bestand in dieser Gruppe auch die höchste Inkonsistenz bei der Entscheidung über die histologische Sicherung innerhalb desselben Falls.



---

## Diskussion

---

### 4.1 Vergleichende Untersuchung mittels CEM und OCT

Ziel dieser Arbeit war es, die diagnostische Wertigkeit der CEM und der OCT bei der primären Einschätzung von klinisch nicht eindeutig klassifizierbaren Läsionen an den Stimmklappen in einem klinischen Setting zu evaluieren.

Es konnte gezeigt werden, dass beide Techniken ein hohes Potential bei der Unterscheidung der intraepithelialen Läsionen in low-grade und high-grade Dysplasien besitzen. Die CEM erbrachte in den 47 mit beiden Techniken vergleichend untersuchten Fällen keine falsch-positiven und drei falsch-negative Diagnosen. Somit ergab sich eine Sensitivität von 86% bei einer Spezifität von 100% und einer Vorhersagegenauigkeit von 94%. Cohens Kappa betrug 0,91, was einer sehr guten Übereinstimmung der Ergebnisse mit der Histopathologie entspricht.

Der Einsatz der OCT in diesen Fällen führte zu einer Sensitivität von 100%, einer Spezifität von 80% und einer Vorhersagegenauigkeit von 89%. Als Maß der Übereinstimmung wurde ein Kappa-Wert von 0,75 errechnet. Fünf falsch-positive standen keinem falsch-negativen Befund gegenüber.

Während beim Einsatz der CEM mit drei Fällen eher eine Tendenz zur Diagnose eines geringeren Dysplasie-Grades vorherrschte, wurde mit dem OCT-Verfahren in fünf Fällen ein schwereres Stadium angenommen, als sich histopathologisch nachweisen ließ. Das Zusammenführen beider Techniken ermöglichte in der hier verwendeten Vorgehensweise zwar einen Ausgleich der Tendenz der CEM zum Unterschätzen in in allen drei falsch-negativen Fällen. Da jedoch nur bei negativem Befund sowohl in der CEM als auch in der OCT eine low-grade SIL angenommen wurde, blieb es bei den fünf falsch-positiven Befunden aus der OCT-Diagnostik. Insgesamt zeigte die hier verwendete Kombinationsmethode beider Verfahren daher keinen Unterschied zu den allein durch die OCT erreichten Werten. Interessanterweise präsentierte sich die einzige moderate Dysplasie in beiden Verfahren als falsch-negativ. Hierbei gilt es zu bedenken, dass die Zuteilung der histologischen moderaten Dysplasie zu high- bzw. low-grade in verschiedenen Arbeiten variiert und auch histologisch schwer zu treffen ist. Hier wird in der Literatur jedoch eine Unterscheidung von Läsionen der Stimmklappen im Gegensatz zur Mundhöhle getroffen, die sich in der hier verwendeten Zuteilung widerspiegelt. [Gale et al. 2005] [Warnakulasuriya et al. 2008] [Sengiz et al. 2004]

Die technische Umsetzung und der Einsatz beider Verfahren erwiesen sich als

komplikationslos. Sowohl die Endoskop-basierte konfokale Endomikroskopie als auch die in das OP-Mikroskop integrierte OCT-Einheit verlängerten durch die intraoperativen Untersuchungen die OP-Zeit um maximal fünf bis zehn Minuten. Die gering erhöhte Narkosezeit im Rahmen der Panendoskopie scheint hier daher nicht ins Gewicht zu fallen. Es kam zu keinen unerwünschten Ereignissen oder Nebenwirkungen durch die Untersuchungen, zumal die CEM-Untersuchungen ex vivo vorgenommen wurden.

Sowohl für den erfahrenen Untersucher als auch für den unerfahrenen Kollegen zeigten sich im Handling beider Methoden nach kurzer Einarbeitung keine besonderen Probleme oder Herausforderungen.

Die Kopplung des konfokalen Mikroskops an das starre Endoskop erbrachte eine laterale Auflösung von 1-2  $\mu\text{m}$  bei einer axialen Auflösung von 5  $\mu\text{m}$  und eine maximale Eindringtiefe von etwa 300  $\mu\text{m}$ , die aber zumeist nicht realisiert werden konnte. Sie ermöglichte so eine zelluläre bis subzelluläre Darstellung. Durch das hohe Auflösungsvermögen scheint die CEM somit zu Recht als „virtuelle Biopsie“ bezeichnet zu werden und kann in-vivo eine Untersuchung des Epithels nach histologischen Malignitätskriterien ermöglichen. [Amos und White 2003] Das OCT-System der Firma Thorlabs Inc., Newton, USA erreichte eine laterale Auflösung von ca. 10,6  $\mu\text{m}$  und eine axiale Auflösung von ca. 12  $\mu\text{m}$ , an der Stimmlippe konnten Tiefen von 1-1,5 mm dargestellt werden. Hier sieht man die Möglichkeiten zum ergänzenden Einsatz beider Verfahren. Während die CEM eine Beurteilung nach histomorphologischen Kriterien im zellulären und subzellulären Bereich ermöglicht, bietet die OCT eine Tiefenmessung des Epithels sowie eine Untersuchung des Übergangs von Epithel zu Lamina propria auf Integrität. Mit der OCT ist eine Zuteilung zu den einzelnen Dysplasie-Graden zuallererst nur über die Epitheldicke möglich. Die ergänzenden Informationen beider Systeme müssen daher zusammen betrachtet werden und in noch zu entwickelnden Algorithmen zu einer Diagnose zusammengeführt werden.

Die konventionellen bildgebenden Verfahren wie Ultraschall, CT oder MRT reichen an dieses Auflösungsvermögen nicht heran. Im CT bzw. MRT wird eine Auflösung von 0,5-1 mm erreicht [Black et al. 1997] [Andrew 1992], die der Sonographie liegt zwischen 200-500  $\mu\text{m}$  [Goldberg et al. 1993]. Die Hochfrequenz-Sonographie erreicht hingegen eine Auflösung von lateral etwa 200  $\mu\text{m}$  und axial etwa 80  $\mu\text{m}$  mit einer Tiefendarstellung von bis zu 15 mm und kann damit als ergänzende und im Vergleich zur OCT kostengünstigere Technik betrachtet werden. Während die Endosonographie beispielsweise in der Gastroenterologie bereits

regelhaft eingesetzt wird, findet die Verwendung in der Laryngologie bisher nur in Studien statt. [Arens und Glanz 1999] [Kraft und Ahrens 2008] [Kraft et al. 2011] [Kraft et al. 2013]

Die Beurteilung der konfokal-mikroskopisch gewonnenen Bilder erfolgte anhand des Vorhandenseins atypischer Zellen in Relation zur Schichtebene im Epithel, was in dieser Form auch in der histopathologischen Befundung zur Anwendung kommt. Atypische zytomorphologische Parameter konnten zufriedenstellend dargestellt werden. Durch die gesamte Tiefendarstellung des Epithels konnten diese einer bestimmten Höhe zugeordnet und somit den verschiedenen Dysplasiegraden zugeteilt werden. Die zweidimensionalen Bilder erreichen hierbei eine an die Histologie reichende Auflösung. Bilder werden jedoch in Form von horizontalen Schnitten dargestellt, im Gegensatz zur meist sagittalen Schnittführung in der konventionellen Histologie. Ein Vorteil liegt in der in-vivo-Betrachtung, die die Schrumpfungseffekte des Gewebes nach Exzision und histologischer Aufarbeitung vermeidet. [Rohen 1994]

Trotz der von Gale et al. definierten morphologischen Kriterien von epithelialen Vorläuferläsionen [Gale et al. 2005] lässt die konfokale Mikroskopie in der hier angewandten Form nur eine subjektive Auswertung zu. Eine Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers im Umgang mit konfokal-mikroskopischen Bildern und deren Befundung ist auch bei dieser Technik zu finden. Diese Lernkurve erfordert stetes Training in Handhabung und Auswertung. Auch die von Wells et al. postulierte Forderung, dass die Einbindung eines erfahrenen Pathologen bei der Etablierung neuer optischer Diagnostiktechniken notwendig ist und eine Standardisierung in der Anwendung und Bewertung zu erfolgen hat, scheinen hier verständlich. [Wells et al. 2007] Eine Entwicklung von Algorithmen muss hier noch erfolgen, um bei Verbreitung der Technik eine suffiziente Diagnostik gewährleisten zu können. [Liu et al. 2011]

In den OCT-Scans wurde die Epitheldicke gemessen und der Übergang von Epithel und Lamina propria zum subepithelialen Raum auf Integrität untersucht. Die Vermessung des Epithels gestaltete sich unproblematisch und korrelierte in der Auswertung gut mit der Histopathologie. Auch konnte eine durchgehende Basalmembran in den nicht invasiven Läsionen dargestellt werden. In der Literatur werden Probleme in der korrekten Diagnosestellung mit dieser Technik hingegen bei Hyperkeratosen und Ulzera beschrieben. Hyperkeratosen können aufgrund verstärkter Lichtstreuung die Eindringtiefe der OCT

verringern und somit eine adäquate Tiefendarstellung verhindern. Ulzera hingegen sind per se durch einen Durchbruch der Basalmembran charakterisiert und können daher mit invasiven Karzinomen verwechselt werden. [Kraft et al. 2008a] In dieser Studie fanden sich keine starken Hyperkeratosen oder ulzeröse Läsionen, so dass sich diese Problematik nicht in den Ergebnissen widerzuspiegeln scheint.

Kraft et al. beschrieben auch weitere morphologische Merkmale, die sie in der Auswertung der OCT-Daten verwendeten. So wurde beispielsweise das Auftreten von Blutgefäßen im Epithel als Zeichen eines Karzinoms angesehen. [Kraft et al. 2008a] Eine Zusammenführung der bisher veröffentlichten Ergebnisse scheint angebracht, um neben der Epitheldicke und der Basalmembran einheitliche Kriterien zu benennen, so dass das Verfahren anhand allgemeingültiger Auswertungsstandards bewertet werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Kriterien zur Beurteilung der gewonnenen Bilder und Daten fanden bereits in mehreren Arbeiten Verwendung und scheinen aufgrund der Ergebnisse geeignet, eine korrekte Diagnosestellung zu ermöglichen. [Kraft et al. 2008a] [Farahati et al. 2009] [Just et al. 2011] [Just et al. 2012a] [Just und Pau 2013] [Volgger et al. 2013] [Volgger et al. 2015] Dennoch fehlt beiden Techniken die Standardisierung in der Auswertung und Datengewinnung. Insbesondere die noch vergleichsweise junge OCT-Technik zeigt in den letzten Jahren eine rasante Entwicklung, beispielsweise vom Kontaktverfahren zum in dieser Arbeit ermöglichten variablen Arbeitsabstand. [Lüerßen et al. 2006] Um einen breiteren Einsatz beider Techniken zu gewährleisten scheint es daher unabdingbar, eine Vereinheitlichung der Diagnosekriterien im Rahmen standardisierter Leitlinien zu entwickeln.

Die konfokale Endomikroskopie und die optische Kohärenztomographie ermöglichen beide als in-vivo-Verfahren eine non-invasive Diagnostik epithelialer Läsionen. Sie können in der Frühdiagnostik und Verlaufsbeurteilung des Stimmlippenkarzinoms bzw. von dessen Vorläuferläsionen eine wichtige Rolle spielen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren bieten aufgrund ihres Aufbaus noch keine Möglichkeit zur Diagnostik des Kehlkopfs beim wachen Patienten. Die notwendige Intubationsnarkose des Patienten birgt zusätzliche Risiken für den Patienten, insbesondere bei wiederholten Untersuchungen im Rahmen einer Verlaufsdagnostik. Der leitliniengerechten Exzision höhergradiger Dysplasien ist daher mit diesem Aufbau derzeit noch nicht der regelhafte Einsatz optischer Biopsien im Rahmen von Verlaufskontrollen gegenüberzustellen.

Im Gegensatz hierzu können OCT und CEM in vivo in der Mundhöhle durchgeführt werden,

wie eine Vielzahl von Untersuchungen gezeigt hat. [Guo et al. 2006] [Cernat et al. 2012] [Donner et al. 2013] [Donner et al. 2015] Die OCT-Scans mit mehr als 1000 Bildern pro Sekunde scheinen hierbei schnell genug zu sein, so dass Bewegungsartefakte keine Einschränkungen in der Bildqualität erkennen lassen.

Donner et al. beschrieben den erfolgreichen Einsatz der OCT in der Diagnostik von Stimmlippenläsionen bei wachen Patienten mit einem modifizierten Handgerät. [Donner et al. 2013] Dies könnte den Einsatz insbesondere auch bei wiederholten Untersuchungen und anästhesiologischen Risikopatienten ermöglichen. Auch Guo et al. erprobten 2006 ein an ein Laryngoskop angeschlossenes OCT-System, das den Einsatz beim wachen Patienten in einem Praxis-Setting ermöglicht. [Guo et al. 2006] Hier zeigten sich noch Probleme durch Bewegungsartefakte von Patienten und der Hand des Untersuchers. Die aktuell verwendete High-Speed-OCT bietet mit ihrer erhöhten Aufzeichnungsgeschwindigkeit von teilweise mehr als 1000 Bildern pro Sekunde hier eine Verbesserung. Auch der erhöhte variable Messabstand moderner Geräte vereinfacht die Anwendung beim wachen Patienten. Viele weitere Arbeiten sind zuletzt zu diesem Thema erschienen. [Taran Tatla et al. 2012] [Cernat et al. 2012] [Donner et al. 2015]

Die CEM der Stimmlippen ist als Kontaktverfahren auch in der hier angewendeten Endoskopie-basierten Technik vor allem im Rahmen der Mikrolaryngoskopie anwendbar. Die Entwicklung einer Anwendungsmöglichkeit beim wachen Patienten sollte hier weiter erforscht werden.

Die Progressionsrate von Dysplasien zu invasiven Karzinomen haben Weller et al. in ihrer Metaanalyse beschrieben. [Weller et al. 2010] Hier zeigte sich eine generelle Transformationsrate von 14%. In Abhängigkeit vom Schweregrad der Dysplasie ereignete sich bei geringer bis milder Dysplasie eine Transformation bei 10,6% der Patienten, während bei vorbestehender schwerer Dysplasie oder einem Carcinoma in situ 30,4% in ein invasives Karzinom übergingen. Dies zeigt den hohen Stellenwert einer Früherkennung schwerer Dysplasien sowie einer Unterscheidung in low-grade und high-grade Läsionen. Die Histopathologie wird hierbei weiterhin der diagnostische Standard bleiben und nicht durch optische Techniken wie die hier untersuchten ersetzt werden. Dennoch bieten in-vivo-Verfahren Diagnosemöglichkeiten bei einer Minimierung der Risiken für den Patienten, die eine Biopsie birgt. Das Hauptziel muss dabei die Früherkennung von high-grade Läsionen sein, um einer malignen Transformation rechtzeitig vorzubeugen.

## 4.2 Vergleich mit aktuellen Arbeiten zur diagnostischen Wertigkeit von OCT und CEM

### Optische Kohärenztomographie

Vier relevante Publikationen zum Einsatz der OCT an oraler Schleimhaut wurden von einer Forschergruppe der Universität von Kalifornien, Irvine, veröffentlicht. Wong et al. [Wong et al. 2005] verwendeten die OCT in ihrer Studie bei 82 Patienten mit verschiedenen Pathologien des Larynx. Ridgeway et al. [Ridgeway et al. 2006] hingegen untersuchten Schleimhautveränderungen in Oropharynx und Mundhöhle von 41 Patienten. Sowohl mikroanatomische Informationen, als auch die Tiefenmessung des Epithels und das Auffinden und Untersuchen der Basalmembran und Lamina propria konnten realisiert werden. Auch gelang eine Unterscheidung zwischen benignen Prozessen und invasiven Karzinomen. Aufgrund der mikroanatomischen Informationen und der Integrität der Basalmembran konnten Tumorgrenzen zuverlässig bestimmt werden. Begleitend wurden die Epitheldicken der laryngealen Strukturen verglichen, für die Stimmlippen ergab sich hier bei 46 Patienten ein Wert von  $129 \pm 58 \mu\text{m}$ . Die Autoren sahen die zukünftige Anwendung der OCT vor allem in der Möglichkeit zur geführten Biopsie und der Verlaufsbeobachtung prämaligener Prozesse. Da in den benignen und prämaligen Läsionen die Unterscheidung zwischen Epithel und Lamina propria stets gelang, könnte die Früherkennung der malignen Transformation durch die Detektion einer Unterbrechung der Basalmembran gelingen.

Armstrong et al. [Armstrong et al. 2006] führten 26 OCT-Untersuchungen an 22 Patienten mit klinischem Verdacht auf ein Larynxkarzinom oder nach vorangegangener Therapie desselben und einem Rezidivverdacht durch. Die gewonnenen Daten wurden anschließend mit der Histopathologie verglichen. In 18 Fällen fand sich ein invasiv wachsendes Karzinom, welche sich durch einen Kontinuitätsverlust der Basalmembran mittels OCT identifizieren ließen. Auch die Übergangszonen zwischen normalem Epithel und Karzinom konnten identifiziert werden. Hier fand man eine Zunahme der Epitheldicke und einen Verlust der Grenze zwischen Epithel und Lamina propria, sowie teilweise eine Zunahme der zurückgeworfenen Lichtstrahlen aufgrund intraepithelialer Veränderungen. Sechs weitere Fälle wurden als Inflammation, Dysplasie oder Carcinoma in situ eingestuft. Hier gelang in drei Fällen die Identifikation einer intakten Basalmembran; in drei Fällen konnte diese nicht dargestellt werden. Dies führen die Autoren auf das starke exophytische Wachstum dieser Läsion zurück, so dass die Basalmembran unterhalb der maximalen Eindringtiefe der OCT lag. Auch mit der

hohen Epitheldicke einhergehende Hyperkeratosen können laut den Autoren durch einen starken Verlust der Intensität des Lichts im Gewebe zu einer stark verminderten Eindringtiefe führen. Da solche Läsionen allerdings bereits aufgrund ihres klinischen Erscheinens biopsiert werden, sieht der Autor hierdurch keine Einschränkung der OCT.

2009 wurde aus dieser Arbeitsgruppe eine Studie von Wilder-Smith et al. [Wilder-Smith et al. 2009] veröffentlicht. In dieser wurden erythro- und leukoplakische Läsionen der Mundschleimhaut untersucht und die OCT-Daten anschließend durch zwei Untersucher auf einer Skala von normal über die verschiedenen Dysplasie-Grade bis invasives Plattenepithelkarzinom eingeteilt. Es ergab sich ein Kappa-Wert für die Übereinstimmung zwischen Histopathologie und OCT-Auswertung von 0,858. Für die Unterscheidung zwischen Plattenepithelkarzinom und allen übrigen Pathologien wurde eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 97% erreicht. Im Rahmen dieser Studie wurden allerdings inflammatorische und hyperplastische Läsionen von der Auswertung ausgeschlossen, welche in der hier vorliegenden und anderen Studien die meisten Probleme in der Diagnosestellung verursachten.

Zwei weitere Arbeiten zu dieser Thematik stammen von Kraft et al.. In diesen prospektiven Studien wurden OCT-Untersuchungen an 225 laryngealen Läsionen bei 201 Patienten durchgeführt. [Kraft et al. 2009] [Kraft et al. 2008a] Verglichen wurde die histopathologische Diagnose mit der im Rahmen der Mikrolaryngoskopie mit bzw. ohne OCT gewonnenen Verdachtsdiagnose. Eine Einteilung wurde in benigne Läsionen, präkanzeröse Dysplasien gemäß der auch in dieser Arbeit verwendeten WHO-Grade und maligne Läsionen (mikroinvasives bzw. invasives Plattenepithelkarzinom) vorgenommen. Für die Unterscheidung zwischen malignen und nicht-malignen Läsionen konnte in Kombination von Mikrolaryngoskopie und OCT eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 95% erreicht werden. Die Kombination von OCT und Mikrolaryngoskopie war der alleinigen Mikrolaryngoskopie aller drei Gruppen überlegen. Eine Differenzierung des Grads der Dysplasie wurde anhand der Epitheldicke nach den von Arens et al. veröffentlichten Messungen vorgenommen. [Arens et al. 2007] Hier betrug die Übereinstimmung 71%. Insgesamt gelangen übereinstimmende Ergebnisse in der OCT-Untersuchung verglichen mit der Histopathologie in 89% der Fälle und damit in signifikant mehr als in der alleinigen Mikrolaryngoskopie (80%). Für die Autoren liegt der Stellenwert der OCT in der Früherkennung von malignem Wachstum, welches aufgrund einer Größenzunahme des Epithels und einem Durchbrechen der Basalmembran erkannt werden kann. Probleme in der

Auswertung fanden sich auch in dieser Studie bei hyperkeratotischen Läsionen aufgrund der vermehrten Lichtreflektion der oberen Schichten. Tiefe Schichten lassen sich nicht adäquat darstellen, so dass hier kein Ausschluss von Malignität möglich ist. Des Weiteren können Ulzera aufgrund ihrer fehlenden Basalmembran fälschlicherweise mit invasiven Karzinomen verwechselt werden. Zuletzt ist die Abgrenzung mikroinvasiver Karzinome zu einer schweren Dysplasie bzw. einem Carcinoma in situ nur schwer möglich. Hier setzt die räumliche Auflösung der Technik noch Grenzen. Beachtet werden muss im Vergleich mit unseren Ergebnissen, dass den Untersuchern neben den OCT-Daten auch die makroskopischen und haptischen Informationen aus der Mikrolaryngoskopie zur Verfügung standen. Diese konnten in unserer Arbeit nicht in der Bewertung berücksichtigt werden, so dass die Befundung allein auf den gesammelten OCT-Daten beruht.

In der 2010 publizierte Studie von Just et al. [Just et al. 2010] wurden 61 Patienten in zwei Gruppen mittels SD-OCT (ähnlich dem hier verwendeten Gerät) und TD-OCT intraoperativ untersucht. Auch hier erfolgte die Einteilung nach der WHO-Graduierung in benigne Läsionen, geringe, moderate und schwere Dysplasien sowie Carcinoma in situ und mikroinvasive Karzinome. Die Differenzierung wurde anhand der Epitheldicke gemäß den von Kraft et al. und Wong et al. publizierten Daten [Kraft et al. 2008b] [Wong et al. 2005] sowie dem Vorhandensein einer Schichtung in Epithel und Lamina propria vorgenommen. Insgesamt erbrachte die Auswertung eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 89% bei einer Vorhersagegenauigkeit von 88%. Wie in den weiter oben beschriebenen Studien schien auch hier die korrekte Einordnung der OCT-Daten bei hyperkeratotischen und stark exophytisch wachsenden Läsionen erschwert. Hier scheint die OCT keinen Vorteil gegenüber anderen optischen Verfahren zu besitzen. Die vergleichende Anwendung der in das OP-Mikroskop integrierten SD-OCT gegenüber der TD-OCT mittels Endoskop im Kontaktverfahren zeigte laut den Autoren deutliche Vorteile in der Handhabung. Ebenso lag die benötigte Untersuchungszeit durch eine zehnmal höhere Bildakquisitionsrate von 1000 A-Scans pro Sekunde bzw. 1-2 B-Scans weit niedriger. Auch kann die Genauigkeit bei der Biopsieentnahme durch Integration der Technik in das OP-Mikroskop in einem kombinierten Verfahren erhöht werden, da wie in unserem Aufbau die Sicht auf die Stimmlippen durch den Scan nicht unterbrochen wird. Einen möglichen Ansatzpunkt hierbei stellt für die Autoren der Einsatz von Laser Spots dar, um nach Auswertung und Befundung der OCT-Daten die Tumorgrenzen bzw. den gewünschten Biopsieort exakt kennzeichnen zu können.



Aus der Münchner HNO-Universitätsklinik wurde 2012 eine Studie zur Anwendung der OCT bei epithelialen Läsionen des gesamten oberen Aerodigestivtraktes (OADT) publiziert. [Volgger et al. 2013] Bei 74 Patienten wurden insgesamt 100 Fälle untersucht, von denen 63 aus der Mundhöhle stammten, 3 aus dem Oropharynx und 34 den Larynx betrafen. Die Läsionen wurden anhand der mittels eines an ein Endoskop gekoppelten TD-OCT gewonnenen Daten in invasiv wachsend und nicht-invasiv eingeteilt. Vorherrschendes Kriterium hierfür war das Bestehen einer klar erkennbaren Grenze zwischen Epithel und subepithelialelem Raum. In Bezug auf die Histopathologie bei der unverblindeten Auswertung durch den ausführenden Untersucher mit Wissen des klinischen Aspekts zeigte sich eine Sensitivität von 88,9% und eine Spezifität von 89% bezogen auf die Frage nach invasivem Wachstum. Eine anschließende verblindete Auswertung der Daten durch drei Untersucher mit unterschiedlichem Erfahrungsstand erbrachte als Mittelwert eine Sensitivität von 81,5% (100%, 66,7% und 77,8%) und eine Spezifität von 72,5% (75,8%, 71,4% und 70,3%) und zeigt auch den Stellenwert der Erfahrung in der Beurteilung und Anwendung in der Technik, da die besten Werte jeweils durch den erfahrensten Untersucher erbracht wurden. Eine effiziente Lernkurve in der Befundung von OCT-Daten könne nur durch ein konstantes Training und Teaching gelingen. Die Autoren sehen des Weiteren die OCT nicht als alleinstehende Technik zur Diagnostik. Vielmehr müsse dieses Verfahren in Kombination mit dem klinischen Eindruck und makroskopischen Aspekt der Läsion Verwendung finden, was in der Auswertung auch zu deutlich weniger falsch-positiven Befunden führte. Eine Aufschlüsselung der erhobenen Befunde in Mundhöhle und Larynx findet sich leider nicht in der Arbeit. Im Vorfeld der Studie wurde auch die Tiefe des Epithels bei gesunder Schleimhaut an verschiedenen Orten des OADT vermessen. Die Autoren kommen hier zu dem Schluss, dass aufgrund großer interindividueller Unterschiede eine OCT-Messung immer im Vergleich zur Gegenseite bzw. zu nicht betroffener Schleimhaut betrachtet werden sollte. Dies deckt sich auch mit den Werten, die Kaiser et al. in einer ähnlichen Publikation erhoben haben. [Kaiser et al. 2009] Das Stimmlippenepithel zeige auch geringere intra- und interindividuelle Unterschiede in der Dicke im Vergleich zu anderen Orten der Mundschleimhaut. Daher könne eine OCT-Untersuchung hier bessere Ergebnisse erzielen.

Eine direkt vergleichbare Arbeit zur Unterscheidung der Vorläuferläsionen des Stimmlippenkarzinoms unter Abgrenzung von low-grade und high-grade SIL mittels OCT ist bisher mit Ausnahme der Studie von Just et al. noch nicht veröffentlicht worden, weshalb ein

direkter Vergleich unserer Ergebnisse hier schwerfällt. In der untenstehenden Tabelle sind dennoch die Ergebnisse im Vergleich mit den genannten Arbeiten zusammengefasst unter Angabe der jeweiligen Unterscheidungen zu unserer Studie.

Tab.19: Vergleich der statistischen Ergebnisse der zuletzt publizierten Studien zur Anwendung der OCT in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde mit unserer Arbeit. Unterschiede in den Auswertungskriterien oder den untersuchten Fällen sind spezifisch angegeben.

Autoren	Sensitivität	Spezifität	Vorhersagegenauigkeit	Unterschiede zur vorliegenden Studie
Kraft et al. 2009	100%	95%	89%	-differenziert zwischen malignen (mikroinvasives und invasives PEC) und nicht malignen Läsionen
Just et al.2010	88%	89%	88%	-Auswertung analog der hier vorliegenden Kriterien -“Benign lesions were classified as negative findings and all dysplasia grades and carcinoma in situ were classified as positive findings” [Just et al. 2010]
Volgger et al.2012	89%	89%	89%	-differenziert zwischen invasiv (mikroinvasives und invasives PEC) und nicht invasiv -Einschluss des gesamten OADT
eigene Studie	100%	80%	89%	-Differenzierung zwischen low-grade SIL (bis zur moderaten Dysplasie) und high-grade SIL (ab einer schweren Dysplasie)

Die gewonnenen statistischen Werte finden sich ähnlich in vergleichbaren Arbeiten zur OCT im HNO-Bereich wieder. Während die Unterscheidung zwischen invasiv und nicht-invasiv durch die Kontinuität der basalen Zellschicht bzw. der Basalmembran möglich ist, wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine Differenzierung in low-grade und high-grade Dysplasien anhand der gemessenen Epitheldicken vorgenommen. Die Sensitivität von 100% zeigt hier die sehr gute Korrelation der OCT mit der histopathologischen Untersuchung bei high-grade Dysplasien. Dennoch ist die Definition von Epitheldicken bestimmter epithelialer Veränderungen noch weitergehend zu untersuchen. Die Spezifität von 80% zeigt die Problematik des alleinigen Merkmals Epitheldicke zur Differenzierung in high-grade und low-grade Dysplasien. Die bei 180 µm gesetzte Grenze zwischen geringer- und höhergradigen Veränderungen des Epithels liegt leicht unter den Werten, die bisher in Arbeiten zur Epitheldicke epithelialer Läsionen der Stimmlippen veröffentlicht wurden. [Arens et al. 2007] [Kraft et al. 2008] Diese Arbeiten versuchen jedoch im Gegensatz zu dieser Studie, vor allem eine Unterscheidung in benigne und maligne Veränderungen vorzunehmen. Während moderate Dysplasien in der Mundhöhle zum Risikoepithel gezählt werden, erfolgt die Einordnung dieser bei Läsionen der Stimmlippen zu den „low-grade SIL“. Beispielsweise finden sich hier auch in entzündlich verändertem Stimmlippenepithel moderate Dysplasien. [Gale et al. 2005] [Gale et al. 2009] Die verwendete Grenze von 180 µm bestätigte sich in den

Ergebnissen, muss aber in Zukunft an einer größeren Patientenzahl verifiziert werden. Eine vergleichende Messung am gesunden Epithel der Gegenseite könnte zu einer Verbesserung der Diagnostik führen, um beispielsweise die interindividuellen Unterschiede in der Ausprägung der Epitheldicke festzustellen und analog zu diesen probandenspezifische Werte für die Differenzierung festzulegen. Ob dies anhand zu definierender variabler Werte in Bezug auf die Epitheldicke der gesunden Schleimhaut möglich ist, kann nur in einer weiteren vergleichenden Studie mit einer entsprechenden Patientenzahl festgestellt werden.

### **Konfokale Endomikroskopie**

Prospektive Studien zur konfokal-endomikroskopischen in-vivo-Diagnostik des Epithels der Stimmlippen oder des oberen Aerodigestivtrakts mit statistischer Auswertung der Ergebnisse sind aktuell nur vereinzelt veröffentlicht worden. Publikationen zum Einsatz dieser Technik sind vermehrt in anderen medizinischen Fachbereichen erschienen.

In der Gastroenterologie wurden zuletzt zahlreiche Arbeiten zur Anwendung der CEM im Rahmen der Endoskopie veröffentlicht. Ein Überblick hierzu wurde an der Mainzer Universitätsklinik veröffentlicht. [Goetz 2014] Die dort ansässige Arbeitsgruppe zeigte 2006 den Nutzen der CEM als „in-vivo-Histologie“ bei Patienten mit Barrett-Ösophagus und den assoziierten Neoplasien der Speiseröhrenschleimhaut. [Kiesslich et al. 2006] In der Unterscheidung zwischen Neoplasien (alle Dysplasien und Karzinome) und nicht neoplastischen Läsionen (gesund, gastrale und Barrett-Schleimhaut) mittels CEM bei Patienten mit Barrett-Ösophagus wurde eine Sensitivität von 93% bei einer Spezifität von 98% erreicht. Die Vorhersagegenauigkeit betrug 97%. Eine Studie aus Italien erreichte ähnliche Ergebnisse. [Trovato et al. 2013] Der Einsatz bei weiteren Neoplasien des Gastrointestinaltrakts wurde ebenfalls untersucht. [Goetz und Kiesslich 2008] Es zeigte sich bei Einsatz der CEM eine Vorhersagegenauigkeit von 96,8% für eine Umwandlung des Ösophagus-Epithels hin zu einem Barrett-Ösophagus. Auch in der Diagnostik des Ausmaßes chronisch entzündlicher Darmerkrankungen kam dieses Verfahren bereits zum Einsatz und zeigte durchweg gute Ergebnisse. [Lim et al. 2014] Zur CEM in der Gastroenterologie sind bereits eine Vielzahl an Veröffentlichungen erschienen. Dies liegt auch an der guten Zugänglichkeit der zu untersuchenden Läsionen im Rahmen etablierter endoskopischer

Untersuchungen. Die Kopplung der CEM an ein flexibles Endoskop ist hier regelhaft möglich. Es existieren ebenfalls Studien zur molekularen Tumordiagnostik bei Magenkarzinomen. So konnten Li et al. durch den Einsatz fluoreszierender Antikörper spezifische molekulare Marker des Tumors mit der CEM sichtbar machen. Dies kann neben der direkten Diagnose eine konkrete Hilfe zur geführten Biopsie geben, um die Wertigkeit der Histopathologie zu erhöhen. [Li et al. 2013]

In einer Pilotstudie untersuchte die Mainzer Gruppe auch den Einsatz der Technik an der Mundschleimhaut und im Oropharynx. [Haxel et al. 2010] Hier wurden fünf Regionen bei gesunden Probanden in-vivo untersucht und die Praktikabilität der eingesetzten Technik untersucht. Verwendung fand das gleiche an ein flexibles Endoskop gekoppelte CEM-System, dass bereits in den Arbeiten zum Gastrointestinaltrakt benutzt wurde. Schwächen fanden die Autoren vor allem in Bewegungsartefakten bei der Datengewinnung, da die Untersuchung am wachen Patienten erfolgte. Auch schienen der Oropharynx und die hintere Mundhöhle für dieses System nur bedingt zugänglich zu sein, ausgelöste Würgreflexe verhinderten beispielsweise die Untersuchung der Stimmritzen. Resezierte maligne Läsionen wurden ex-vivo untersucht und mit der Pathologie verglichen. Durch den Einsatz eines starren Endoskops im Rahmen der Mikrolaryngoskopie gelang hingegen auch die Datenaufnahme im hinteren Oropharynx und auch am Larynx. [Pogorzelski et al. 2012] Allen Arbeiten gemein ist, im Gegensatz zu der hier vorliegenden Studie, der Einsatz von Kontrastmitteln wie Fluorescein i.v. oder Acriflavin-Hydrochlorid ex-vivo. Dies erhöht den Kontrast und scheint auch tiefere Schichten besser darstellen zu können. In weiteren Studien zur CEM wird der Einsatz solcher Kontrastmittel auch bei der Untersuchung des Larynx tiefergehend zu bewerten sein.

An der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Rostock wurde der Einsatz der Technik an oropharyngealer Schleimhaut und dem Larynx in diversen Studien erforscht. Eine erste Publikation zur Untersuchung ex-vivo an 43 Gewebeproben von 46 Patienten erbrachte eine Sensitivität von 72,7% und eine Spezifität von 82,9% bei der Unterscheidung invasiver Karzinome von benignen und prämaligen Läsionen. [Just et al. 2006] In dieser und den folgenden Arbeiten kam der HRT II in Kombination mit dem Rostock Cornea Modul zum Einsatz, welcher auch in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurde. In benigner Schleimhaut konnten die morphologischen Veränderungen der Zellen beim Übergang der superfiziellen Schichten zur basalen Zellschicht (Größenabnahme der Zellen, erhöhtes Kern-Plasma-Verhältnis) als Zeichen der Differenzierung gesunder Epithelzellen

dargestellt werden. Eine direkte Darstellung der Basalmembran gelang nicht, jedoch ließ sich die basale Zellschicht des Epithels klar abgrenzen und auch der subepitheliale Raum mit seinen parallelen elastischen Fasern visualisieren. Als durchschnittliche Epitheldicke über den Stimmlippen wurden  $103 \pm 25,1 \mu\text{m}$  errechnet. Schwierigkeiten zeigten sich wie in unserer Studie in der Diagnose von hyperkeratotischen und stark hyperplastischen Läsionen, was zu falsch-negativen Befunden führte. Hier sehen die Autoren die verminderte Eindringtiefe aufgrund des höheren Refraktionsindex von Keratin verglichen mit dem von Zytoplasma als Hauptursache. [Brunsting und Mullaney 1974] Als diagnostisches Kriterium für entzündliche Veränderungen konnten sog. Koilozyten dargestellt werden, die sich als aufballonierte Zellen mit Vakuolen im Zytoplasma präsentierten.

In einer konfokal-mikroskopischen Untersuchung an sieben Laryngektomie-Präparaten bei T4-Karzinomen konnten die gewonnenen Erkenntnisse verifiziert werden. [Just et al. 2007] Eine in-vivo-Untersuchung der Mundschleimhaut an neun Patienten mit malignomverdächtigen Läsionen sowie zwölf Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren nach Radiochemotherapie erbrachte eine Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 73% in der Unterscheidung zwischen Karzinomen auf der einen und Keratosen, Entzündungen und Dysplasien auf der anderen Seite. [Just et al. 2008]

Die in unserer Arbeit verwendete Kopplung des konfokalen Mikroskops an ein starres Endoskop wurde von Farahati et al. in einem tierexperimentellen Setting untersucht. [Farahati et al. 2009] Durch Gabe von 4-Nitroquinolin-1-Oxid als Trinklösung wurde bei Mäusen die Tumorgenese an der Zunge induziert. Nachfolgend wurde die Zunge ex-vivo konfokalmikroskopisch untersucht und befundet und die Ergebnisse mit der histopathologischen Auswertung verglichen. Eine Differenzierung wurde in geringe bzw. moderate Dysplasie und schwere Dysplasie bzw. Carcinoma in situ vorgenommen und zeigte eine Sensitivität von 73% und eine Spezifität von 88%. Die Abhängigkeit der Auswertung der Bilddaten ist für die Autoren in einem hohen Maß von der Erfahrung im Umgang mit diesen abhängig und stellt somit eine subjektive Bewertung dar. Ähnliches gelte auch für die histopathologische Diagnostik. Entzündliches oder regenerativ verändertes Epithel könne in einem geringeren Ausmaß atypische Morphologien zeigen, die sich sonst vor allem in Dysplasien finden lässt. Die Interpretation der Befunde zeigte in ihrer Genauigkeit daher eine typische Lernkurve, wie sie auch in der Histopathologie anzutreffen sei.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie an der Louisiana State University untersuchte Epithelläsionen des Kopf- und Halsbereichs an 21 Patienten, unter anderem auch drei an den

Stimmklappen. [Nathan et al. 2014] Unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Cellvizio-CEM-System und einer angeschlossenen Gastroflex-Sonde (Mauna Kea Technologies, Paris, Frankreich) wurde nach Kontrastmittelgabe (Fluorescein) die Untersuchung der Läsion sowie der kontralateralen gesunden Schleimhaut durchgeführt. Von den gewonnenen Bildern wurden 16 ausgesucht und vier Untersuchern zur Auswertung vorgelegt. In der Unterscheidung von nicht-dysplastischen und dysplastischen Veränderungen wurde eine Sensitivität von 80% bei einer Spezifität von 100% erreicht. Die Differenzierung von Karzinomen und Dysplasien aller Grade zeigte eine Sensitivität von 85,7% und ebenfalls eine Spezifität von 100% bei einem PPW von 100% und einem NPW von 80%. Probleme zeigten sich in der Visualisierung des Zungenrückens aufgrund der keratinisierten filiformen Geschmackspapillen. Auch muss bei den erzielten Ergebnissen bedacht werden, dass eine Vorauswahl von Bildern stattfand, in denen typische Veränderungen der jeweiligen Entität optimal dargestellt sind. In unserer Arbeit wurden die Bilder nicht vorausgewählt, es wurde zu jeder Läsion ein entsprechender Bilder-Datensatz erstellt und ausgewertet, ungeachtet eventueller Schwierigkeiten in der Interpretation. Die Autoren stellen in der Diskussion den Vorteil optischer Biopsien im Vergleich zur konventionellen Biopsie heraus. Da die gesamte Läsion mit ihrer Umgebung dargestellt werden kann, umgeht man die Gefahr falsch-negativer Ergebnisse aufgrund einer falschen Biopsieentnahmestelle.

Volgger et al. veröffentlichten 2015 die Ergebnisse ihrer prospektiven Studie. [Volgger et al. 2015] Sie untersuchten Leukoplakien und Erythroplakien, also primär flache Läsionen der Stimmklappen zunächst mittels OCT, um Karzinome auszuschließen. Nachfolgend wurden 27 Läsionen in-vivo nach Fluorescein-Gabe i.v. mit dem kommerziell erhältlichen und auch von Nathan et al. verwendeten Cellvizio-CEM-System und angeschlossener Gastroflex-Sonde differenziert. Eingeteilt wurden die gefundenen zellulären Veränderungen analog zu den in dieser Arbeit verwendeten Kriterien. Allerdings bietet Fluorescein nur eine Kontrasterhöhung des Extrazellulärraums, weshalb die Autoren als Hauptkriterium die Zellgröße alleine und das Verhältnis im Zellverband nutzten. Form und Größe der Zellkerne wurden nicht zur Unterscheidung in Betracht gezogen. Die Klassifizierung in nicht bzw. gering dysplastischen Läsionen auf der einen und moderaten und schweren Dysplasien auf der anderen Seite erreichte eine Sensitivität von 100%, während sich eine Spezifität von lediglich 40% ergab. Sieben von 15 benignen Hyperplasien wurden hier als Dysplasien bewertet. Als Hauptgrund sahen die Autoren einige Probleme in der Bildqualität. Neben der schon angesprochenen Problematik hyperkeratotischer Läsionen ist die korrekte Positionierung des verwendeten

starren Geräts im rechten Winkel beispielsweise an der vorderen Kommissur erschwert. Auch die automatische Fokuseinstellung funktionierte in stärker mit Speichel bedeckten Läsionen nicht zufriedenstellend. Aufgrund einer unzureichenden Bildqualität konnten zwei der 27 Läsionen nicht klassifiziert werden. Auch das Verwenden der Zellgröße und Form als alleiniges Entscheidungsmerkmal genügt für die Autoren nicht, um eine suffiziente Auswertung der optischen Biopsien zu ermöglichen. Ein zugelassenes Kontrastmittel für den Intrazellularraum bei Verwendung der CEM ist derzeit allerdings nicht auf dem Markt erhältlich, zumal Acriflavin in Verdacht steht eine mutagene Wirkung zu haben.

Tab.20: Vergleich der statistischen Ergebnisse der zuletzt publizierten Studien zur Anwendung der CEM mit unserer Arbeit. Unterschiede in den Auswertungskriterien und dem Studienaufbau sind spezifisch angegeben.

Autoren	Sensitivität	Spezifität	Vorhersagegenauigkeit	Unterschiede zur vorliegenden Studie und eingesetztes System
Farahati et al.2009	73%	88%	84%	-murines Tiermodell -ex-vivo-Untersuchung von Zungenläsionen -Differenzierung analog unserer Studie in low- und high-grade Läsionen -"The latter feature was graded on a two-tiered scale as mild / moderate dysplasia (resembling low-grade SIL), or severe / carcinoma in situ (resembling high-grade SIL)." [Farahati et al. 2009]
Nathan et al.2014	86%	100%	nicht angegeben	-Cellvizio mit Gastroflex-Sonde und Fluorescein -Läsionen des oberen Aerodigestivtrakts -Differenzierung von Dysplasien und Karzinomen -Vorauswahl der Bilder vor der Auswertung
Volgger et al.2015	100%	40%	nicht angegeben	-Cellvizio mit Gastroflex-Sonde und Fluorescein -Zellgröße und -verband als alleiniges Kriterium -Differenzierung in low- und high-grade Läsionen mit moderater Dysplasie als high-grade
eigene Studie	86%	100%	94%	-HRT II mit Rostock Cornea Modul und angeschlossenem Endoskop -Vorkommen von Zellatypien in Relation zur Schichttiefe als Kriterium -Differenzierung zwischen low-grade SIL (bis zur moderaten Dysplasie) und high-grade SIL (ab einer schweren Dysplasie)

Verglichen mit den oben genannten Studien zur konfokalen Endomikroskopie in der Laryngo-Rhino-Otologie konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Trotz einer Vorauswahl der in die Auswertung einbezogenen Bilder und der Verwendung von Fluorescein als Kontrastmittel erreichen Nathan et al. gleiche Werte für Sensitivität und Spezifität, und auch PPW und NPW variieren nur gering. Die von Volgger et al. gezeigte Spezifität von nur 40% lässt sich eventuell auf die Probleme bei der Bildakquise zurückführen, die erzielte Sensitivität von 100% konnte weder in dieser Arbeit noch in einer anderen veröffentlichten Arbeit erreicht werden. Zu beachten ist hierbei jedoch die höhere Patientenzahl der

vorliegenden Arbeit (47 bzw. 97 vs. 27). Wie in dieser Arbeit liegt der Fokus auch bei Volgger et al. auf der Unterscheidung von low-grade und high-grade Dysplasien, da dies einen direkten Einfluss in der Therapie bedeutet. Im Gegensatz zur hier verwendeten Unterscheidung wird in ihrer Arbeit die Grenze jedoch zwischen geringer und moderater Dysplasie gezogen. Schwere Dysplasien werden aufgrund ihres hohen Progressionsrisikos exziiert, während eine geringgradige Dysplasie im Verlauf beobachtet werden kann. Diese Beobachtung wird auch für die moderate Dysplasie der Stimmlippe bevorzugt, da diese auch in Entzündungen des Epithels vorkommen kann. [Gale et al. 2009] Es ergab sich eine gute Korrelation mit der Histopathologie, die den möglichen Gewinn durch den Einsatz der Technik zeigt.

Insgesamt fügen sich unsere Ergebnisse gut in die bisher publizierten Zahlen zur Anwendung der Technik im OADT ein und zeigen ähnlich hoffnungsvolle Ergebnisse, so dass weitere vergleichende Untersuchungen der CEM an größeren Studienpopulationen folgen sollten.

### **Kombinierter Einsatz von CEM und OCT**

Publikationen zum vergleichenden Einsatz der beiden optischen Verfahren an einem Patientengut sind derzeit noch nicht veröffentlicht. Diese Arbeit stellt zum ersten Mal die Ergebnisse aus der CEM und der OCT direkt vergleichend vor, daher ist eine Einordnung der gewonnenen Erkenntnisse zu den Ergebnissen anderer Arbeiten nur bedingt möglich.

Einzig Volgger et al. beschreiben in ihrer oben bereits aufgeführten Veröffentlichung Ergebnisse mit einem gestuften Verfahren unter Verwendung beider Techniken. [Volgger et al. 2015] Hierzu wurde bei 35 Patienten mit Leukoplakien und Erythroplakien des Larynx und der Mundhöhle eine OCT-Untersuchung durchgeführt. 30 Läsionen präsentierten eine erhaltene horizontale Schichtung mit intakter Basalmembran bei einer Erhöhung der Epitheldicke. Diese wurden nun folgend konfokal-mikroskopisch untersucht und entsprechend dem Dysplasiegrad eingeteilt bzw. als benigne diagnostiziert. Fünf Läsionen, die eine Diskontinuität der Basalmembran aufwiesen, wurden direkt biopsiert. Die Ergebnisse sind im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben. Das gestufte Vorgehen versucht, die Vorteile beider Techniken zu vereinen. Leider sind die histologischen Ergebnisse der fünf direkt nach der OCT-Untersuchung biopsierten Läsionen nicht aufgeführt, hier endete laut den Autoren die



Studienteilnahme.

Die Kombination beider Techniken erbrachte in unserer Studie keine Verbesserung zur alleinigen OCT-Diagnostik. Damit einhergehend zeigte sich eine Verbesserung der allein mittels CEM erreichten Sensitivität (100% zu 86%). Da ein positiver Befund in einer der beiden Techniken genügte, um die Läsion als high-grade SIL zu klassifizieren, konnte die leichte Tendenz in der CEM zum Unterbewerten hier verbessert werden. Jedoch mussten Einbußen bei Spezifität (100% zu 80%) und Vorhersagegenauigkeit (94% zu 89%) hingenommen werden. Somit zeigte das verwendete Verfahren der Kombination keinen deutlichen diagnostischen Vorteil gegenüber dem alleinigen Einsatz der Techniken.

Der kombinierte Einsatz der CEM und der OCT muss in Studien weitergehend untersucht werden. Hier gilt es insbesondere, ein abgestuftes Verfahren zu entwickeln, welches die Vorteile beider Techniken vereint. Ziel muss es sein, annähernd optimale Werte wie die in der alleinigen konfokal-mikroskopischen Untersuchung erreichte Spezifität von 100% unter Beibehaltung der Sensitivität zu generieren.

#### **4.3 Klinische Pilotstudie zur Beurteilung unklarer Stimmlippenläsionen**

Die klinische Evaluation hatte zum Ziel, die Übereinstimmung der intraoperativen Einschätzung mit dem tatsächlichen histologischen Befund in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers zu bewerten. Es zeigte sich, dass die höchste Übereinstimmung in der Gruppe mit der größten Erfahrung in der Kehlkopfchirurgie vorlag. Dennoch ergab sich selbst hier nur ein Kappa von 0,325 ( $p < 0,001$ ), was nur einem leichten Grad der Übereinstimmung entspricht. Dies weist darauf hin, dass optisch ähnlich erscheinende Veränderungen der Stimmlippen nur schwer aufgrund ihres Aussehens einer klinischen Entität zugeordnet werden können.

Auch die Wahl des Orts zur Biopsie variiert zwischen den verschiedenen Gruppen. Wie Welge-Lüssen et al. demonstriert haben, können in derselben Biopsie verschiedene Entitäten von Entzündung bis zum invasiven Karzinom vorkommen, während nur wenige Millimeter entfernt ein anderer histopathologischer Befund gestellt wird, der kein Karzinom beinhaltet. [Welge-Lüssen et al. 1996] In dieser retrospektiven Studie benötigten 32 von 468 Patienten zwei bis sechs Biopsien, um den klinisch suspekten Befund eines Kehlkopfkarakzinoms histologisch zu bestätigen. Diese Re-Biopsien können jedoch zu einer Zeitverzögerung bis zur

endgültigen Diagnosestellung und Einleitung einer entsprechenden Therapie führen. Welge-Lüssen et al. beschreiben hierzu eine Verzögerung von bis zu drei Monaten, die noch keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose und die Möglichkeit zum Organerhalt haben soll. Amar et al. benennen allerdings einen Median von 49 Tagen, Allison et al. zeigten, dass ein negativer Einfluss auf das diagnostizierte Stadium bereits bei einer Verzögerung der Behandlung von mehr als einem Monat zu erwarten sei. [Amar et al. 2010] [Allison et al. 1998] Unter Berücksichtigung der malignen Transformationsrate von 30,4% bei Vorliegen einer schweren Dysplasie und Carcinoma in situ [Weller et al. 2010] ist die Schlussfolgerung der Arbeiten zu diesem Thema die Empfehlung, eine Re-Biopsie alsbald durchzuführen, um eine korrekte Diagnose zu erhalten.

Die Präzision der Probenentnahme sowie die klinische Erfahrung des Chirurgen scheinen also eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies ist nicht zuletzt deshalb von Bedeutung, da jede Biopsie für sich das Risiko einer Stimmverschlechterung bis hin zum dauerhaften Stimmverlust beinhaltet. [Theissing 2006] In der hier vorliegenden Studie zeigt sich hierzu ein positiver Zusammenhang zwischen der Erfahrung des Untersuchers und der Bewertung der Läsionen sowie der Wahl des Orts zur Probenentnahme.

Warnakulasuriya et al. zeigten, dass der Befund derselben Probe von Pathologe zu Pathologe variieren und zu unterschiedlich schweren Diagnosen führen kann. [Warnakulasuriya et al. 2008] Für die Studie wurden die histopathologischen Befunde als Standard gegenüber den Diagnosen der Studienteilnehmer gesetzt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bereits die histologische Bewertung nicht den tatsächlich vorliegenden Grad der Läsion wiedergibt und somit zu anderen Werten der Übereinstimmung führt, als sie die vorliegenden Zahlen hergeben. Für die Studie wurden daher alle vorliegenden Histologien durch einen Pathologen befundet, um dieses Risiko zu minimieren und eine Variabilität der Ergebnisse durch verschiedene Pathologen zu vermeiden.

2010 wurde in England ein nationaler Workshop von 40 HNO-Chirurgen und 40 Pathologen abgehalten. Die Ergebnisse dieses Treffens wurden von Mehanna et al. als Konsensus-Papier veröffentlicht. [Mehanna et al. 2010] Es wurde festgehalten, dass das initiale Management verdächtiger Läsionen einem erfahrenen Kopf- und Halschirurgen übertragen werden sollte. Des Weiteren wurde ein „histological mapping“ mit multiplen Biopsien bei großflächigen Leukoplakien empfohlen. Auch sollten die Biopiate groß bzw. tief genug sein, um verlässliche

Aussagen zur vorliegenden Läsionen treffen zu können. Hier stellt sich die Frage, ob mit steigender Erfahrung des Untersuchers eine höhere Genauigkeit bei der Identifikation der verdächtigen Läsionen und der Wahl des Entnahmeorts einhergeht, wie es die Autoren voraussetzen.

In der eigenen Studie zeigte sich, dass die erfahrenen Kehlkopfchirurgen nur in einem Fall zu einer Chordektomie und prozentual am häufigsten zu einer Exzision der gesamten Läsion neigten. Auch bei der Wahl der vorgegebenen Regionen identifizierten sie mit einer höheren Genauigkeit die Orte, die klinisch auffällig waren und für die auch ein histopathologischer Befund vorlag. Da allerdings nicht für jede vorgegebene Region ein histopathologischer Befund vorlag, dies hätte grundlegend zumindest eine subepitheliale Chordektomie erforderlich gemacht, sind diese Aussagen mit Einschränkungen zu treffen. Abgegebene Verdachtsdiagnosen zu nicht befundeten Regionen konnten nicht in die Auswertung miteinbezogen werden.

Die Ergebnisse zeigen auch, dass offensichtlich dem Teaching junger HNO-Ärzte durch erfahrene Kollegen eine hohe Bedeutung in der Ausbildung beizumessen sein dürfte. Im Rahmen von Panendoskopien besteht hier die Möglichkeit, dass erfahrene Kehlkopfchirurgen ihren noch wenig geschulten Kollegen vermehrt Hilfestellung in der Untersuchung und Diagnosestellung bieten.

Kritisch anzumerken sind einige Punkte zum Studiendesign. Die Tatsache, dass es sich hier um eine monozentrische Studie handelt, begrenzt natürlich die Teilnehmerzahl aus dem Feld der erfahrenen und unerfahrenen Kehlkopfchirurgen. Im Rahmen eines multizentrischen Ansatzes sollte hierbei der Fokus auch verstärkt auf spezialisierte Kopf- und Halschirurgen gelegt werden anstatt des allgemeinen HNO- Arztes. Dies wird auch als Konsens von HNO-Ärzten und Pathologen zum generellen Management von Leukoplakien und verdächtigen Läsionen formuliert. [Mehanna et al. 2010]

Hierbei ist auch die Gruppenzuordnung der Teilnehmer zu hinterfragen. Aufgrund des monozentrischen Ansatzes wurden HNO-Ärzte mit mehr als 10 kehlkopfchirurgischen Eingriffen pro Jahr zur Gruppe der erfahrenen Kehlkopfchirurgen gezählt. In einem multizentrischen Setting sind hier gegebenenfalls höhere Kriterien bei der Zuordnung zu setzen, um eine Gruppe mit signifikant größerer klinischer Erfahrung zu bilden. Unter diesem

Gesichtspunkt sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie als Orientierung im Rahmen einer monozentrischen Untersuchung anzusehen.

Des Weiteren stehen dem Kliniker neben dem reinen Blickbefund noch diverse weitere Parameter wie Anamnese, Verschieblichkeit bzw. Beweglichkeit des Epithels, Stimmanalyse oder Stroboskopie zur Verfügung. Die Gesamtschau all dieser Befunde erlaubt es ihm eine valide Verdachtsdiagnose zu treffen, die dann in der Histopathologie zu bestätigen wäre. Die hier vorliegende klinische Pilotstudie beschränkt sich nur auf den mikrolaryngoskopischen Bildbefund.

2015 wurde eine Studie der HNO-Abteilung der Louisiana State University publiziert, die sich mit der Interobserver-Übereinstimmung bei Bewertung von 50 CEM-Bildern und zehn Videos von den Patienten der weiter oben beschriebenen Studie von Nathan et al. beschäftigt. [Moore et al. 2016] Hierzu wurde das Bildmaterial sieben Chirurgen und einem Pathologen vorgelegt, alle mit einem unterschiedlichen Erfahrungslevel in der Verwendung der CEM. Nach einem Training anhand ebenfalls der Studie entstammenden Bildmaterials mussten die Läsionen in normal bzw. nicht-dysplastisch, dysplastisch und karzinomatös unterschieden werden. Für die Übereinstimmung aller acht Untersucher ergab sich ein Kappa-Wert von 0,66. Verglichen mit der Histopathologie ergab sich ein Kappa-Wert von 0,73 für die Bilder und 0,70 für die Videos. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Übereinstimmung verglichen mit der rein makroskopischen Bewertung, wie sie in unserer Studie vollzogen wurde. Die Verwendung eines kurzen einführenden Trainings anhand definierter Bilder scheint hier bereits eine korrekte Zuordnung der Daten zu verbessern, jedoch fehlt ein Vergleich ohne Absolvieren des Trainings. Die Autoren beider Studien sehen dennoch nur eine kurze Lernkurve, die zur richtigen Befundung konfokal-mikroskopischer Daten nötig sei.

2011 wurden auf der 3. wissenschaftlichen Tagung der Head and Neck Optical Diagnosis Society (HNODS) verschiedene Möglichkeiten der optischen Diagnostik bei Tumoren des Kopf- und Halsbereichs diskutiert. Ziel dieser optischen Biopsien ist es, dem Kliniker Informationen zu liefern, die eine bessere Unterscheidung zwischen high-grade und low-grade Läsionen bewirken. Die Histopathologie als Goldstandard sollen sie nicht ersetzen. [Jerjes et al. 2011] Zwei der diskutierten Techniken wurden im Hauptteil dieser Arbeit verwendet und auf ihre Anwendbarkeit untersucht.

## 4.4 Ausblick

Die hier gewonnenen Ergebnisse aus dem Einsatz der CEM und der OCT an klinisch nicht eindeutig klassifizierbaren Läsionen der Stimmlippen zeigen den Erkenntnisgewinn in der Diagnostik, den beide Verfahren dem geschulten Untersucher ermöglichen können. Eine Sensitivität von 100% bei Verwendung der OCT bzw. in Kombination beider Untersuchungsmethoden spiegelt das Leistungsvermögen optischer Technologien in der Hals-Nasen und Ohrenheilkunde wider.

Maßgebliche Faktoren zur Verhinderung der malignen Transformation intraepithelialer Dysplasien des Larynx sind eine exakte Diagnosestellung und die Früherkennung. [Weller et al. 2010] [Shaughnessy et al. 2002] Die in dieser Arbeit untersuchten Technologien besitzen ein hohes Potenzial, die Diagnostik und Früherkennung epithelialer Vorläuferläsionen zu verbessern. Neben der Standarddiagnostik in Form von Anamnese, Inspektion, Beurteilung der Schwingungsfähigkeit u.ä. können die nicht-invasiven optischen Verfahren dem Untersucher ein diagnostisches Mittel sein, um insbesondere klinisch nicht eindeutig zuordenbare Läsionen einer Entität zuzuteilen und entsprechend zu therapieren. Hierzu scheint ein gestuftes Vorgehen geeignet, wie es Volgger et al. aktuell vorschlagen. [Volgger et al. 2015] Die beiden Technologien sollten daher nicht konkurrierend, sondern vielmehr als sich ergänzend gesehen werden, so wie es sich auch in einer Sensitivität von 100% in der Kombination von CEM und OCT wiederfindet. Einer primären Messung der Tiefe und Kontrolle der Integrität der Basalmembran mittels der OCT kann sich eine CEM-Untersuchung bei den nicht-invasiven Läsionen nach den auch hier verwendeten Kriterien der Zellarchitektur anschließen.

Auch eine Kombination beider Technologien in einem OP-Mikroskop ist ein möglicher nächster Schritt und wurde in der Schilddrüsenchirurgie bereits an einem Prototyp vorgestellt. [De Montigny et al. 2014]

Wie Welge-Lüssen et al. zeigten, ist die Wahl des Biopsieortes ein wichtiges Kriterium für die korrekte Diagnosefindung. [Welge-Lüssen et al. 1996] Diese scheint auch von der Erfahrung des Untersuchers abhängig, wie die klinische Pilotstudie dieser Arbeit erkennen ließ. Hier kann durch den Einsatz von optischen Systemen zur in-vivo-Untersuchung eine geführte Biopsie ermöglicht werden, um die Präzision der Biopsieentnahme signifikant zu erhöhen. Ein digitales Mapping der Stimmlippe mit Festlegung der Tumorgrenzen kann bei der

Festlegung der Therapiestrategie von Nutzen sein. Die Kombination eines zur Tumorexzision verwendeten OP-Lasers mit einem OCT-Gerät wurde bereits beschrieben [Shakhov et al. 2001] und scheint einen Vorteil in der organerhaltenden Larynx-Chirurgie darzustellen, da er eine präzisere Lokalisation der pathologischen Bereiche ermöglicht.

Eine andere erfolgversprechende Weiterentwicklung der OCT-Technik stellt die Polarisations-sensitive OCT (PS-OCT) dar. In diesem Verfahren wird neben der Intensität des zurückgeworfenen Lichts zusätzlich die Polarisation desselben registriert. Die mathematische Umwandlung ermöglicht so beispielsweise eine Detektion von Narbengewebe durch eine starke Zunahme der Doppelbrechung, während bei kanzerösen Veränderungen der Stimmlippen typischerweise ein Verlust der Doppelbrechung auffällt. [Pierce et al. 2002] [de Boer und Milner 2002] [Burns et al. 2011] Diese Technik kann somit Sensitivität und Spezifität der OCT in der Diagnostik weiter verbessern und den Informationsgewinn erhöhen.

Beide Techniken haben als optische Verfahren eine Begrenzung in der darstellbaren Tiefe. Die Problematik hyperkeratotischer Läsionen und massiver Hyperplasien zeigte sich in vielen Studien zum Einsatz der Verfahren, insbesondere im oberen Aerodigestivtrakt. Eine Möglichkeit, diese Limitationen bei der CEM zu umgehen könnte die Entwicklung einer Nadel-Sonde darstellen, die intraepithelial die Datenaufnahme beginnt und sich beispielsweise auch vermehrt auf subepitheliale Veränderungen oder die dortige Tumorausbreitung fokussieren lässt. Erste Versuche hierzu wurden von Konda et al. in der Untersuchung von Pankreaszysten in Verbindung mit der endoskopischen Sonographie vorgestellt. [Konda et al. 2013] Ob sich hier ein tatsächlicher diagnostischer Vorteil in der HNO-Heilkunde ergeben kann, muss aber zunächst noch gezeigt werden.

Eine automatisierte computergestützte Auswertung der gewonnenen Daten ist für beide Verfahren ein wichtiger Ansatz. Sowohl die Messung der Epitheldicke im OCT-Scan als auch die Auswertung der CEM-Bilder anhand der mikroanatomischen Veränderungen könnten so standardisiert werden. Auch wäre die Auswertung nun nicht mehr vor allem von der Erfahrung des Anwenders abhängig. Erste Vorschläge hierzu wurden bereits für die CEM-Diagnostik des Barrett-Ösophagus [Muldoon et al. 2010] und colorektaler Polypen [André et al. 2012] publiziert. Um dies auch für Veränderungen des Stimmlippenepithels zu realisieren, müssen aber zunächst noch weitere Standards in der diagnostischen Auswertung und eine Vereinheitlichung der verwendeten Techniken Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Die hier verwendeten Verfahren stellen nur zwei der aktuell im Rahmen von Studien untersuchten Techniken dar, die die Diagnostik und Früherkennung laryngealer Schleimhautveränderungen verbessern und vereinfachen sollen. Wie auf der HNODS-Tagung 2011 bereits beschrieben [Jerjes et al. 2011], sind derzeit mehrere optische Diagnoseverfahren in der Erprobung. In einer Sonderausgabe widmete sich zuletzt auch die Zeitschrift HNO dem aktuellen Stand dieser „optischen Biopsien“. [Betz 2016] Ein Überblick über die bisher veröffentlichten Daten zur optischen Kohärenztomographie widmet sich den auch in dieser Arbeit beschriebenen Problemen bei stark hyperkeratotischen oder ulzerösen Läsionen und sieht die zukünftige Anwendung vor allem in geführten Biopsien sowie der Festlegung von Tumorgrenzen und der Verlaufskontrolle. [Volgger et al. 2016] Das Narrow Band Imaging (NBI) präsentiert sich ebenfalls als zuverlässiges Verfahren. Im Gegensatz zur OCT, die eine Untersuchung in die Tiefe ermöglicht, ist das NBI ein horizontales Verfahren. Vaskuläre, epitheliale und bindegewebige Veränderungen in malignen und prämaligen Läsionen scheinen zuverlässig verifiziert werden zu können, insbesondere stellt der intraoperative Einsatz in Kombination mit der Kontaktendoskopie eine zuverlässige Methode zur Detektion von Schnitträndern dar. [Arens et al. 2016] Auch die Autofluoreszenzendoskopie zeigt vielversprechende Ergebnisse in der nicht-invasiven Diagnostik. In Kombination mit der konventionellen Weißlichtendoskopie lassen sich signifikant höhere Werte für Sensitivität und Spezifität erreichen als in der Weißlichtendoskopie alleine. Der Verlust der Autofluoreszenz, Gefäßtypen und porphyrin-produzierende Bakterien stellten hier Malignitätskriterien dar, die den Autoren eine Unterscheidung in benigne (inklusive geringer Dysplasien) und maligne Veränderungen ermöglichten. [Fostiropoulos et al. 2016] [Kraft et al. 2016] Die Verwendung hyperspektraler Bildstapel, ursprünglich ein Verfahren aus der Erdoberflächenvermessung, hat im Gegensatz zu den anderen Verfahren den Vorteil einer automatisierten Auswertung, so dass die Untersucher-Abhängigkeit der Befundbewertung entfällt. Bilder bestimmter Wellenlängen werden endoskopisch akquiriert, anschließend wird automatisiert die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer malignen Veränderung prozessiert. Dieses sehr neue Verfahren sowie die Auswertungskriterien müssen noch an großen Studienpopulationen getestet werden, eine Machbarkeitsstudie zeigte aber bereits ermutigende Ergebnisse. [Laffers et al. 2016] Zusammenfassend scheint die automatisierte Auswertung für alle Verfahren einen hohen Stellenwert zu besitzen, um eine regelhafte Anwendung außerhalb von Studien und Häusern der Maximalversorgung zu ermöglichen. Eine Kombination horizontaler (z.B. NBI) und vertikaler Verfahren (z.B. CEM) vereint die

Vorteile beider Technologien und kann geführte Biopsien und die Detektion von Schnittträndern bieten. [Betz et al. 2016] Bis zum regelhaften Einsatz der verschiedenen optischen Diagnoseverfahren in der Hals-, Nasen, und Ohrenheilkunde gilt es jedoch weitere Studien im Multi-Center-Design durchzuführen und direkt vergleichbare Ergebnisse für die Techniken zu erbringen. Der technologische Fortschritt zeigt sich in der rasanten Weiterentwicklung der Verfahren, so dass eine weitere Verbesserung beispielsweise in Auflösungsvermögen oder Automatisierung in der nächsten Zeit erwartet werden kann.



## Zusammenfassung

---

Eine frühzeitige diagnostische Unterscheidung von Dysplasien des Stimmlippenepithels in „low-grade“ und „high-grade“ SIL stellt ein wichtiges Entscheidungskriterium für die weitere Therapieplanung dar. In dieser Studie wird der Einsatz der OCT und der CEM bei der Diagnose unklarer Stimmlippenveränderungen untersucht. Beide Verfahren werden hinsichtlich ihrer Genauigkeit mit dem histopathologischen Befund der gezielten Biopsie verglichen.

Eine parallel durchgeführte Studie untersuchte vorab die Einschätzung von Stimmlippenbefunden allein anhand des in der Mikrolaryngoskopie gewonnenen Bildmaterials. Hier zeigte sich auch in der Gruppe der Teilnehmer mit mehr als zehn Kehlkopfchirurgischen Eingriffen pro Jahr lediglich eine Vorhersagegenauigkeit von 65%, mit einer Sensitivität von 85%, einer Spezifität von 56%, PPW und NPW lagen bei 44% bzw. 90%. Hier zeigt sich der potentielle Nutzen von diagnostischen Verfahren wie der CEM und der OCT, die der Kliniker zur Entscheidungsfindung nutzen kann.

In der prospektiven klinisch-pathologischen Studie wurden 67 Patienten mit unklaren Veränderungen des Stimmlippenepithels eingeschlossen, bei denen der Verdacht auf eine low-grade“ oder „high-grade“ SIL bestand. Im Rahmen der in Vollnarkose durchgeführten Mikrolaryngoskopie wurden die Untersuchungen mittels OCT und CEM durchgeführt, eine entnommene Biopsie des verdächtigen Befunds wurde zur histopathologischen Untersuchung eingeschendet.

Hierzu wurde ein in das OP-Mikroskop integriertes SD-OCT im Non-Kontakt-Verfahren verwendet, für die CEM-Untersuchung wurde das konfokale Mikroskop mit einem starren Endoskop für ein Kontakt-Verfahren verbunden.

In der Studie wurden 47 Biopsien bei 39 Patienten ausgewertet und für beide Techniken Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert sowie die Vorhersagegenauigkeit berechnet. Die CEM zeigte hier eine Sensitivität von 86% (95%-KI 64-96%), eine Spezifität von 100% (95%-KI 83-100%), PPW und NPW lagen bei 100% (95%-KI 79-100%) bzw. 89% (95%-KI 71-97%) mit einer Genauigkeit von 94%. Der OCT-Einsatz erbrachte eine Sensitivität von 100% (95%-KI 82-100%) und eine Spezifität von 80% (95%-KI 59-92%), PPW und NPW betrugen 81% (95%-KI 61-93%) bzw. 100% (95%-KI von 80-100%) bei einer Vorhersagegenauigkeit von 89%. In der Kombination beider Verfahren

und einer gemeinsamen Auswertung konnten die Werte der OCT wiederholt werden, eine Verbesserung der statistischen Parameter konnte nicht erreicht werden.

Unsere Studie zeigt das Potential von CEM und OCT in der Erkennung von „high-grade“ Läsionen des Stimmlippenepithels. Weitere Studien beispielsweise in Bezug auf die Entwicklung eines abgestuften Verfahrens zur Kombination beider Techniken müssen hier noch folgen. Auch muss die automatisierte Auswertung der gewonnenen Bilddaten in weiteren Forschungsarbeiten untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

---

- Alfano et al. 1984:** Alfano R, Tata D, Cordero J, Tomashefsky P, Longo F, Alfano M (1984) Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. *IEEE Journal of Quantum Electronics* 1220:1507-1511.
- Allison et al. 1998:** Allison P, Franco E, Black M, Feine J (1998) The role of professional diagnostic delays in the prognosis of upper aerodigestive tract carcinoma. *Oral Oncol* 34(2):147-153.
- Altman 1990:** *Practical Statistics for Medical Research* (1990) Altman DG; Chapman & Hall; ISBN 978-0412276309.
- Álvarez-Marcos et al. 2013:** Álvarez-Marcos C, López F, Alonso-Guervós M, Domínguez F, Suárez C, Hermesen MA, Llorente JL (2013) Genetic and protein markers related to laryngeal epithelial precursor lesions and their neoplastic progression. *Acta Otolaryngol* 133(3):281-290.
- Amar et al. 2010:** Amar A, Chedid HM, Franzi SA, Rapoport A (2010) Diagnostic and therapeutic delay in patients with larynx cancer at a reference public hospital. *Braz J Otorhinolaryngol* 76(6):700-703.
- Amos and White 2003:** Amos W, White J (2003) How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Bio Cell* 95(6):335-342.
- André et al. 2012:** Andre B, Vercauteren T, Buchner AM, Krishna M, Ayache N, Wallace MB (2012) Software for automated classification of probe-based confocal laserendomicroscopy videos of colorectal polyps. *World J Gastroenterol* 2012 18(39):5560–5569.
- Andrew 1992:** Andrew ER (1992) Nuclear magnetic resonance and the brain. *Brain Topogr* 5(2):129-133.
- Arens et al. 2007:** Arens C, Glanz H, Wönckhaus J, Hersemeyer K, Kraft M (2007) Histologic assessment of epithelial thickness in early laryngeal cancer or precursor lesions and its impact on endoscopic imaging. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264(6):645-649.
- Arens et al. 2016:** Arens C, Betz C, Kraft M, Voigt-Zimmermann S (2016) „Narrow band imaging“ zur Früherkennung epithelialer Dysplasien und mikroinvasiver Karzinome im oberen Luft-Speise-Weg. *HNO* 64:19-26.
- Arens und Glanz 1999:** Arens C, Glanz H (1999) Endoscopic high-frequency ultrasound of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 256(6):316-322.
- Arifler et al. 2003:** Arifler D, Guillaud M, Carraro A, Malpica A, Follen M, Richards-Kortum R (2003) Light scattering from normal and dysplastic cervical cells at different epithelial depths: finite-difference time-domain modeling with a perfectly matched layer boundarycondition. *J Biomed Opt* 8(3):484-494.
- Armstrong et al. 2006:** Armstrong WB, Ridgway JM, Vokes DE, Guo S, Perez J, Jackson RP, Gu M, Su J, Crumley RL, Shibuya TY, Mahmood U, Chen Z, Wong BJ (2006) Optical coherence tomography of laryngeal cancer. *Laryngoscope* 116(7):1107-13.
- Aumüller et al. 2010:** *Duale Reihe: Anatomie* (2010) Aumüller G, Schmidt W, Aust G, Schmitz F, Doll A, Schulte E, Engele J, Spanel-Borowski K, Kirsch J, Wolff W, Mense S, Wurzing L, Reißig

D, Zilch H, Salvetter J; Thieme; 2.Auflage ISBN 3131360429.

**Bailly et al. 2006:** Bailly N, Sherif Z A, Pleyer U, Rieck P (2006) Konfokale Scanning-Mikroskopie: Eine vergleichende Darstellung von Hornhautdystrophiebefunden mittels ConfoScanP2 und Rostock Cornea Modul-HRT II. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 223(9):735-742.

**Bakker Schut et al. 2000:** Bakker Schut T C, Witjes M J, Sterenborg H J, Speelman O C, Roodenburg J L, Marple E T, Bruining H A, Puppels G J (2000) In vivo detection of dysplastic tissue by Raman spectroscopy. *Anal Chem* 72(24):6010-6018.

**Betz 2016:** Betz C S (2016) Optische Diagnoseverfahren zur Verbesserung der Tumorfrühdagnostik im oberen Luft-Speise-Weg. *HNO* 64:2-3.

**Betz et al. 2016:** Betz C, Kraft M, Arens C, Schuster M, Pfeffer C, Rühm A, Stepp H, Englhard A, Volgger V (2016) Optische Diagnoseverfahren zur Tumorfrühdagnostik im oberen Luft-Speise-Weg Quo vadis?. *HNO* 64:41-48.

**Black et al. 1997:** Black PM, Moriarty T, Alexander E 3rd, Stieg P, Woodard EJ, Gleason PL, Martin CH, Kikinis R, Schwartz RB, Jolesz FA (1997) Development and implementation of intraoperative magnetic resonance imaging and its neurosurgical applications. *Neurosurgery* 41(4):831-842.

**Böcker et al. 2012:** Pathologie (2012) Böcker W, Denk H, Heitz P, Höfler G, Kreipe H, Moch H; Elsevier; 5.Auflage ISBN 9783437423840.

**Brunsting und Mullaney 1974:** Brunsting A, Mullaney PF (1974) Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J* 14(6):439-453.

**Bühling et al. 2008:** Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie (2008) Bühling KJ, Lepenies J, Witt K; Elsevier; 4.Auflage ISBN 9783437424120.

**Burns et al. 2011:** Burns JA, Kim KH, deBoer JF, Anderson RR, Zeitels SM (2011) Polarization-sensitive optical coherence tomography imaging of benign and malignant laryngeal lesions: an in vivo study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 145(1):91-99.

**Cahill und Mortensen 2010:** Cahill RA, Mortensen NJ (2010) Intraoperative augmented reality for laparoscopic colorectal surgery by intraoperative near-infrared fluorescence imaging and optical coherence tomography. *Minerva Chir* 65(4):451-462.

**Cernat et al. 2012:** Cernat R, Tatla TS, Pang J, Tadrous PJ, Bradu A, Dobre G, Gelikonov G, Gelikonov V, Podoleanu AG. (2012) Dual instrument for in vivo and ex vivo OCT imaging in an ENT department. *Biomed Opt Express* 3(12):3346-3356.

**Cohen 1960:** Cohen J (1960) A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement* 20(1):37-46.

**de Boer und Milner 2002:** de Boer JF, Milner TE (2002) Review of polarization sensitive optical coherence tomography and Stokes vector determination. *J Biomed Opt* 7(3):359-371.

**De Melo et al. 2003:** De Melo ECM, Lemos M, Filho JAX, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH (2003) Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope* 113(12):2187-2191.

**De Montigny et al. 2014:** De Montigny E, Strupler M, Goulamhoussen N, Madore W, Ayad T,

- Leblond F, Boudoux C (2014) Multi-scale and functional microscopy for head and neck tissue identification. Lecture 8926-126 at the SPIE BIOS 2014 & 6th Scientific Meeting of the Head & Neck Optical Diagnostic Society (HNODS); 01.02.-06.02.2014, San Francisco, CA.. Available at: <http://spie.org/Documents/ConferencesExhibitions/PW14B-Abstracts.pdf>; Abgerufen am 05.12.2015
- Denk et al. 1998:** Denk DM, Swoboda H, Steiner E (1998) Physiologie des Larynx. *Der Radiologe* 38(2):63-70.
- Donner et al. 2013:** Donner S, Deutsch S, Bleeker S, Ripken T, Krüger A (2013) Concept for tremor compensation for a handheld OCT-laryngoscope. aus: *Head and Neck Optical Diagnostics*. Betz C, Wong B; SPIE Proceedings (Optical Society of America) 8805:880503.  
doi:10.1117/12.2032388
- Donner et al. 2015:** Donner S, Bleeker S, Ripken T, Ptok M, Jungheim M, Krueger A (2015) Automated working distance adjustment enables optical coherence tomography of the human larynx in awake patients. *J Med Imaging (Bellingham)* 2(2):026003.
- Drezek et al. 1999:** Drezek R, Dunn A, Richards-Kortum R (1999) Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements. *Appl Opt* 38(16):3651- 3661.
- Eversole 2009:** Eversole LR (2009) Dysplasia of the upper aerodigestive tract squamous epithelium. *Head Neck Pathol* 3(1):63-68.
- Farahati et al. 2009:** Farahati B, Stachs O, Prall F, Stave J, Guthoff R, Pau HW, Just T (2009) Rigid confocal endoscopy for in vivo imaging of experimental oral squamous intra-epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 39(4):318-327.
- Forastiere et al. 2001:** Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D (2001) Head and neck cancer. *N Engl J Med* 345(26):1890-1900.
- Forsea et al. 2010:** Forsea AM, Carstea EM, Ghervase L, Giurcaneanu C, Pavelescu G (2010) Clinical application of optical coherence tomography for the imaging of non-melanocytic cutaneous tumors: a pilot multi-modal study. *J Med Life* 3(4):381-389.
- Fostiropoulos et al. 2016:** Fostiropoulos K, Arens C, Betz C, Kraft M (2016) Nichtinvasive Bildgebung mittels Autofluoreszenzendoskopie: Stellenwert bei der Früherfassung des Kehlkopfkarzinoms. *HNO* 64:13-18.
- Freedman et al. 2008:** Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, Abnet CC (2008) Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Int J Cancer* 122(10):2330-2336.
- Fujimura 1981:** Fujimura O (1981) Body-cover theory of the vocal fold and its phonetic implications. aus: *Vocal fold physiology*. Stevens K, Hirano M (Hrsg.). University of Tokyo Press, Tokyo:271-281.
- Gale et al. 2005:** Gale N, Pilch B Z, Sidransky D, Westra W H, Califano J (2005) Epithelial precursor lesions. aus: *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumors*. Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (Hrsg.) IARC Press Lyon: 140-143. ISBN 92 832 2417 5

- Gale et al. 2009:** Gale N, Michaels L, Luzar B, Poljak M, Zidar N, Fischinger J, Cardesa A (2009) Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology* 54(6):639-656.
- Gale und Zidar 2009:** Gale N, Zidar N (2009) Benigne und potentiell maligne Läsionen des Plattenepithels und Plattenepithelkarzinom. aus: Pathologie. Cardesa A, Rudolph P, Mentzel T, Slootweg P (Hrsg.) Springer Verlag Berlin Heidelberg: 3-46. ISBN 978-3-540-72885-6
- Goetz 2014:** Goetz M (2014) Microscopy of the gastrointestinal tract: confocal endomicroscopy - clinical and scientific benefits. *Zentralbl Chir* 139(4):428-433.
- Goetz und Kiesslich 2008:** Goetz M, Kiesslich R (2008) Confocal endomicroscopy: in vivo diagnosis of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. *Anticancer Res* 28(1B):353-360.
- Goldberg et al. 1993:** Goldberg BB, Liu JB, Merton DA, Feld RI, Miller LS, Cohn HE, Barbot D, Gillum DR, Vernick JJ, Winkel CA (1993) Sonographically guided laparoscopy and mediastinoscopy using miniature catheter-based transducers. *J Ultrasound Med* 12(1):49-54.
- Grouven et al. 2007:** Grouven U, Bender R, Ziegler A, Lange S (2007) Der Kappa-Koeffizient. *Dtsch Med Wochenschr* 132:65-68.
- Guo et al. 2006:** Guo S, Hutchison R, Jackson RP, Kohli A, Sharp T, Orwin E, Haskell R, Chen Z, Wong BJ (2006) Office-based optical coherence tomographic imaging of human vocal cords. *J Biomed Opt* 11(3):030501-030501-3.
- Habbous et al. 2014:** Habbous S, Harland LT, La Delfa A, Fadhel E, Xu W, Liu FF, Goldstein D, Waldron J, Huang SH, O'Sullivan B, Liu G (2014) Comorbidity and prognosis in head and neck cancers: Differences by subsite, stage, and human papillomavirus status. *Head Neck* 36(6):802-810.
- Hashibe et al. 2009:** Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang ZF, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P (2009) Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(2):541-550.
- Haxel et al. 2010:** Haxel BR, Goetz M, Kiesslich R, Gosepath J (2010) Confocal endomicroscopy: a novel application for imaging of oral and oropharyngeal mucosa in human. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267(3):443-448.
- Hellquist et al. 1999:** Hellquist H, Cardesa A, Gale N, Kambic V, Michaels L (1999) Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathology* 34(3):226-233.
- Heymann 1933:** Heymann O (1933) Die Stroboskopie im Dienste der Laryngoskopie. *Archiv für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilkunde* 136:64-116.
- Hirano 1974:** Hirano M (1974) Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its

variations. *Folia Phoniatri (Basel)* 26(2):89-94.

**Huang et al. 1991:** Huang D, Swanson E A, Lin C P, Schuman J S, Stinson W G, Chang W, Hee M R, Flotte T, Gregory K, Puliafito C A, et al. (1991) Optical coherence tomography. *Science* 254(5035):1178-1181.

**Jahn und Blitzer 1996:** Jahn A, Blitzer A (1996) A short history of laryngoscopy. *Logoped Phoniatri Vocol* 21(3-4):181-185.

**Jerjes et al. 2011:** Jerjes W K, Upile T, Wong B J, Betz C S, Sterenborg H J, Witjes M J, Berg K, van Veen R, Biel M A, El-Naggar A K, Mosse C A, Olivo M, Richards-Kortum R, Robinson D J, Rosen J, Yodh A G, Kendall C, Ilgner J F, Amelink A, Bagnato V, Barr H, Bolotine L, Bigio I, Chen Z, Choo-Smith L, D'Cruz A K, Gillenwater A, Leunig A, MacRobert A J, McKenzie G, Sandison A, Soo K C, Stepp H, Stone N, Svanberg K, Bing Tan I, Wilson B C, Wolfson H, Hopper C (2011) The future of medical diagnostics: review paper. *Head Neck Oncol* 3:38.

**Johansson et al. 2008:** Johansson A, Kromer K, Sroka R, Stepp H (2008) Clinical optical diagnostics- Status and perspectives. *Medical Laser Application* 23(4):155-174.

**Just et al. 2006:** Just T, Stave J, Boltze C, Wree A, Kramp B, Guthoff R, Pau HW (2006) Laser Scanning Microscopy of the Human Larynx Mucosa: A Preliminary Ex Vivo Study. *Laryngoscope* 116(7):1136-1141.

**Just et al. 2007:** Just T, Stave J, Kreutzer HJ, Guthoff R, Pau HW (2007) Confocal microscopic evaluation of epithelia of the larynx. *Laryngorhinootologie* 86(9):644-648.

**Just et al. 2008:** Just T, Stave J, Bombor I, Kreutzer HJ, Guthoff R, Pau HW (2008) In vivo diagnosis of epithelial changes of the oropharynx using confocal microscopy. *Laryngorhinootologie* 87(3):174-180.

**Just et al. 2009a:** Just T, Lankenau E, Hüttmann G, Pau HW (2009) Intra-operative application of optical coherence tomography with an operating microscope. *J Laryngol Otol* 123(9):1027-1030.

**Just et al. 2009b:** Just T, Srur E, Stachs O, Pau HW (2009) Volumetry of human taste buds using laser scanning microscopy. *J Laryngol Otol* 123(10):1125-1130.

**Just et al. 2010:** Just T, Lankenau E, Prall F, Hüttmann G, Pau HW, Sommer K (2010) Optical Coherence Tomography Allows for the Reliable Identification of Laryngeal Epithelial Dysplasia and for Precise Biopsy: A Clinicopathological Study of 61 Patients Undergoing Microlaryngoscopy. *Laryngoscope* 120(10):1964-1970.

**Just et al. 2011:** Just T, Stave J, Stachs O, Witt G, Guthoff R, Pau HW (2011) Rigid confocal endoscopy of the larynx. aus: *Laser Scanning, Theory and Applications*. Wang Ch (Hrsg.). InTech 97-112. ISBN 978-953-307-205-0

**Just et al. 2012a:** Just T, Wiechmann T, Stachs O, Stave J, Hüttmann G, Pau HW (2012) Confocal endomicroscopy of the larynx. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* 8207:56.

**Just und Pau 2013:** Just T, Pau HW (2012) Intra- operative application of confocal endomicroscopy using a rigid endoscope. *J Laryngol Otol* 127(6):599-604.

- Kademani et al. 2005:** Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, Homer L (2005) Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg* 63(11):1599-1605.
- Kaiser et al. 2009:** Kaiser ML, Rubinstein M, Vokes DE, Ridgway JM, Guo S, Gu M, Crumley RL, Armstrong WB, Chen Z, Wong BJ (2009) Laryngeal epithelial thickness: a comparison between optical coherence tomography and histology. *Clin Otolaryngol* 34(5):460-466.
- Kallaway et al. 2013:** Kallaway C, Almond M L, Barr H, Wood J, Hutchings J, Kendall C, Stone N (2013) Advances in the clinical application of Raman spectroscopy for cancer diagnostics. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 10(3):207-219.
- Kapil et al. 2005:** Kapil U, Singh P, Bahadur S, Dwivedi SN, Singh R, Shukla N (2005) Assessment of risk factors in laryngeal cancer in India: a case-control study. *Asian Pac J Cancer* 6(2):202-207.
- Kiesslich et al. 2004:** Kiesslich R, Burg J, Vieth M et al. (2004) Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 127(3):706-713.
- Kiesslich et al. 2006:** Kiesslich R, Gossner L, Goetz M, Dahlmann A, Vieth M, Stolte M, Hoffman A, Jung M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF (2006) In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4(8):979-987.
- Kleinsasser 1962:** Kleinsasser O (1962) Die Laryngomikroskopie (Lupenlaryngoskopie) und ihre Bedeutung für die Erkennung der Vorerkrankungen und Frühformen des Stimmlippenkarzinoms. *Archiv für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilkunde* 180(2):724-727.
- Kleinsasser 1987:** Tumoren des Larynx und des Hypopharynx (1987) Kleinsasser O; Georg Thieme Verlag Stuttgart; 1.Auflage ISBN 3-13-687801-9.
- Kleinsasser 1991:** Mikrolaryngoskopie und endolaryngeale Mikrochirurgie: Technik und typische Befunde (1991) Kleinsasser O; Schattauer; 3.Auflage ISBN 3-7945-1381-9.
- Konda et al. 2013:** Konda VJ, Meining A, Jamil LH, Giovannini M, Hwang JH, Wallace MB, Chang KJ, Siddiqui UD, Hart J, Lo SK, Saunders MD, Aslanian HR, Wroblewski K, Waxman I (2013) A pilot study of in vivo identification of pancreatic cystic neoplasms with needle-based confocal laser endomicroscopy under endosonographic guidance. *Endoscopy* 45(12):1006-1013.
- Kraft et al. 2008a:** Kraft M, Glanz H, von Gerlach S, Wisweh H, Lubatschowski H, Arens C (2008) Clinical value of optical coherence tomography in laryngology. *Head Neck* 30(12):1628-1635.
- Kraft et al. 2008b:** Kraft M, Lüerssen K, Lubatschowski H, Woenckhaus J, Schöberlein S, Glanz H, Arens C (2008) Mucosal lesions in the larynx: predictive value of new imaging modalities for a histological diagnosis. *HNO* 56(6):609-613.
- Kraft et al. 2009:** Kraft M, Glanz H, von Gerlach S, Wisweh H, Lubatschowski H, Arens C (2009) Optical coherence tomography : significance of a new method for assessing unclear laryngeal pathologies. *HNO* 58(5):472-479.
- Kraft et al. 2011:** Kraft M, Arnoux A, Arens C (2011) Ultrasound microscopy in the upper aerodigestive tract. Initial clinical experiences. *HNO* 59(4):366-70.
- Kraft et al. 2013:** Kraft M, Bruns N, Hügens-Penzel M, Arens C (2013) Clinical value of



endosonography in the assessment of laryngeal cancer. *Head Neck* 35(2):195-200.

**Kraft et al. 2016:** Kraft M, Arens C, Betz C, Fostiropoulos K (2016) Fluoreszenzbildgebung in der Laryngologie: Physikalische Grundlagen, klinische Anwendung und Studienergebnisse. *HNO* 64:4-12.

**Kraft und Arens 2008:** Kraft M, Arens C (2008) Technique of high-frequency endolaryngeal ultrasound. *J Laryngol Otol* 122(10):1109-1111.

**Kundt et al. 2014:** Epidemiologie und Medizinische Biometrie. Eine kurzgefasste übersichtliche Einführung, Skript zum QB1 mit Prüfungsfragen und Übungsaufgaben (2014) Kundt G, Krentz H, Glass Ä; Shaker Verlag; ISBN 978-3-8440-3122-5.

**Laffers et al. 2016:** Laffers W, Westermann S, Regeling B, Martin R, Thies B, Gerstner A, Bootz F, Müller N A (2016) Früherkennung kanzeröser Läsionen in Oropharynx und Mundhöhle Automatisierte Evaluation hyperspektraler Bildstapel. *HNO* 64:27-33.

**Langevin et al. 2013:** Langevin SM, O'Sullivan MH, Valerio JL, Pawlita M, Applebaum KM, Eliot M, McClean MD, Kelsey KT (2013) Occupational asbestos exposure is associated with pharyngeal squamous cell carcinoma in men from the greater Boston area. *Occup Environ Med* 70(12):858-863.

**Lankenau 2013:** Lankenau E, <http://www.opmedt.com/index.php/de/produkte/oct-kamera-am-hi-r1000?id=19>; abgerufen: 25.03.2013, 17:00

**Lankenau et al. 2013:** Lankenau E, Krug M, Oelckers S, Schrage N, Just T, Hüttmann G (2013) iOCT with surgical microscopes: a new imaging during microsurgery. *Advanced Optical Technologies* 2(3):233-239.

**Li et al. 2013:** Li Z, Zuo XL, Li CQ, Zhou CJ, Liu J, Goetz M, Kiesslich R, Wu KC, Fan DM, Li YQ (2013) In vivo molecular imaging of gastric cancer by targeting MG7 antigen with confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* 45(2):79-85.

**Lim et al. 2014:** Lim LG, Neumann J, Hansen T, Goetz M, Hoffman A, Neurath MF, Galle PR, Chan YH, Kiesslich R, Watson AJ (2014) Confocal endomicroscopy identifies loss of local barrier function in the duodenum of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 20(5):892-900.

**Liu et al. 2011:** Liu JT, Loewke NO, Mandella MJ, Levenson RM, Crawford JM, Contag CH (2011) Point-of-care pathology with miniature microscopes. *Anal Cell Pathol (Amst)* 34(3):81-98.

**Lubsen und Olde Kalter 1992:** Lubsen H, Olde Kalter PH (1992) Premalignant laryngeal lesions. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 46(2):117-126.

**Lürßen et al. 2006:** Lürßen K, Lubatschowski H, Ursinus K, Koch R, Ptok M (2006) Charakterisierung von Stimmlippen mittels optischer Kohärenztomographie. *HNO* 54(8):611-615.

**Maier et al. 1992:** Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H (1992) Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Investig* 70(3-4):320-327.

**Masand et al. 2011:** Masand RP, El-Mofty SK, Ma XJ, Luo Y, Flanagan JJ, Lewis JS Jr (2011) Adenosquamous carcinoma of the head and neck: relationship to human papillomavirus and review of

the literature. *Head Neck Pathol* 5(2):108-116.

**Mehanna et al. 2010:** Mehanna H, Paleri V, Robinson A, Wight R, Helliwell T (2010) Consensus statement by otorhinolaryngologists and pathologists on the diagnosis and management of laryngeal dysplasia. *Clin Otolaryngol* 35(3):170-176.

**Mehrad et al. 2013:** Mehrad M, Carpenter DH, Chernock RD, Wang H, Ma XJ, Luo Y, Luo J, Lewis JS Jr, El-Mofty SK (2013) Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: clinicopathologic and molecular features with special reference to human papillomavirus. *Am j surg pathol* 37(9):1349-1356.

**Metcalfe et al. 2014:** Metcalfe CW, Lowe D, Rogers SN (2014) What patients consider important: Temporal variations by early and late stage oral, oropharyngeal and laryngeal subsites. *J Craniomaxillofac Surg* 42(5):641-647.

**Michaels 1997:** Michaels L (1997) The Kambic-Gale Method of Assessment of Epithelial Hyperplastic Lesions of the Larynx in Comparison with the Dysplasia Grade Method. *Acta Otolaryngol Suppl* 527:17-20.

**Minsky 1988:** Minsky M (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10:128-138.

**Moore et al. 2016:** Moore C, Mehta V, Ma X, Chaudhery S, Shi R, Moore-Medlin T, Lian T, Nathan CO (2016) Interobserver agreement of confocal laser endomicroscopy for detection of head and neck neoplasia. *Laryngoscope* 126(3):632-637.

**Muldoon et al. 2010:** Muldoon TJ, Thekkekk N, Roblyer D, Maru D, Harpaz N, Potack J, Anandasabapathy S, Richards-Kortum R (2010) Evaluation of quantitative image analysis criteria for the high-resolution microendoscopic detection of neoplasia in Barrett's esophagus. *J Biomed Opt* 15(2):026027.

**Nathan et al. 2014:** Nathan CA, Kaskas NM, Ma X, Chaudhery S, Lian T, Moore-Medlin T, Shi R, Mehta V (2014) Confocal Laser Endomicroscopy in the Detection of Head and Neck Precancerous Lesions. *Otolaryngol Head Neck Surg* 151(1):73-80.

**Oertel 1895:** Oertel MJ (1895) Das Laryngo-Stroboskop und die laryngostroboskopische Untersuchung. *Archiv für Laryngologie und Rhinologie* 3:1-16.

**Paget-Bailly et al. 2012:** Paget-Bailly S, Cyr D, Luce D (2012) Occupational exposures and cancer of the larynx-systematic review and meta-analysis. *J Occup Environ Med* 54(1):71-84.

**Pierce et al. 2002:** Pierce MC, Park BH, Cense B, deBoer JF (2002) Simultaneous intensity, birefringence, and flow measurements with high-speed fiber-based optical coherence tomography. *Opt Lett* 27(17):1534-1536.

**Podoleanu 2005:** Podoleanu A Gh (2005) Optical coherence tomography. *Br J Radiol* 78(935):976-988.

**Pogorzelski et al. 2012:** Pogorzelski B, Hanenkamp U, Goetz M, Kiesslich R, Gosepath J (2012) Systematic intraoperative application of confocal endomicroscopy for early detection and resection of squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck*

Surg 138(4):404-411.

**Ramroth et al. 2004:** Ramroth H, Dietz A, Becher H (2004) Interaction effects and population-attributable risks for smoking and alcohol on laryngeal cancer and its subsites. A case-control study from Germany. *Methods Inf Med* 43(5):499-504.

**Reinke 1895:** Reinke F (1895) Untersuchungen über das menschliche Stimmband. *Fortschr Med* 13:469-478.

**Reinke 1897:** Reinke F (1897) Über die funktionelle Struktur der menschlichen Stimmlippe mit besonderer Berücksichtigung des elastischen Gewebes. *Anatomische Hefte* 9(1):103-116.

**Richart 1967:** Richart RM (1967) Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 10(4):748-784.

**Ridgeway et al. 2006:** Ridgeway JM, Armstrong WB, Guo S, Mahmood U, Su J, Jackson RP, Shibuya T, Crumley RL, Gu M, Chen Z, Wong BJ (2006) In vivo optical coherence tomography of the human oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132(10):1074-1081.

**Robert Koch-Institut 2010:** Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2010) Robert Koch Institut (Hrsg.) ; RKI Berlin

**Robert Koch-Institut 2012:** Krebs in Deutschland 2007/2008 (2012) Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) ; Berlin; 8.Ausgabe ISBN 978-3-89606-214-7.

**Rodrigo et al. 2012:** Rodrigo JP, García-Pedrero JM, Suárez C, Takes RP, Thompson LD, Slootweg PJ, Woolgar JA, Westra WH, Brakenhoff RH, Rinaldo A, Devaney KO, Williams MD, Gnepp DR, Ferlito A (2012) Biomarkers predicting malignant progression of laryngeal epithelial precursor lesions: a systematic review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 269(4):1073-1083.

**Rohen 1994:** Rohen J (1994) Der Werdegang des histologischen Präparates und die Artefakte. aus: *Histologische Differentialdiagnose: Anleitung zur Diagnose histologischer Präparate*. Rohen J Schattauer Stuttgart; New York 5.Auflage: 3-5. ISBN 3-7945-1676-1

**Schmitt 1999:** Schmitt JM (1999) Optical Coherence Tomography (OCT): A Review. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 5(4):1205-1215.

**Schneider 2012:** Schneider J (2012) Asbestfaserstaubverursachtes Carcinoma in situ des Larynx. *Laryngo-Rhino-Otol* 91(11):712-715.

**Sengiz et al. 2004:** Sengiz S, Pabuccuoglu U, Sarioglu S (2004) Immunohistological comparison of the World Health Organization(WHO) and Ljubljana classifications on the grading of preneoplastic lesions of the larynx. *Pathol Res Pract* 200(3):181-188.

**Sergeev et al. 1997:** Sergeev A M, Gelikonov V M, Gelikonov G V, Feldchtein F I, Kuranov R V, Gladkova N D (1997) In vivo endoscopic OCT imaging of precancer and cancer states of human mucosa. *Opt Express* 1(13):432-440.

**Shakhov et al. 2001:** Shakhov AV, Terentjeva AB, Kamensky VA, Snopova LB, Gelikonov VM, Feldchtein FI, Sergeev AM (2001) Optical coherence tomography monitoring for laser surgery of

laryngeal carcinoma. *J Surg Oncol* 77(4):253-258.

**Shaughnessy et al. 2002:** Shaughnessy JA, Kelloff GJ, Gordon GB, Dannenberg AJ, Hong WK, Fabian CJ, Sigman CC, Bertagnolli MM, Stratton SP, Lam S, Nelson WG, Meyskens FL, Alberts DS, Follen M, Rustgi AK, Papadimitrakopoulou V, Scardino PT, Gazdar AF, Wattenberg LW, Sporn MB, Sakr WA, Lippman SM, Von Hoff DD (2002) Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: an important target for accelerated new agent development. *Clin Cancer Res* 8(2):314-346.

**Shaughnessy et al. 2014:** Shaughnessy JN, Farghaly H, Wilson L, Redman R, Potts K, Bumpous J, Silverman C, Dunlap NE (2014) HPV: A factor in organ preservation for locally advanced larynx and hypopharynx cancer?. *Am J Otolaryngol* 35(1):19-24.

**Smart et al. 1974:** Smart CR, Lyon JL, Skolnick M, Wilson ML, Edwards CB, Cowan LR (1974) Cancer of the head and neck in Utah. *Am j surg* 128(4):463-465.

**Stave et al. 2002:** Stave J, Zinser G, Grümmer G, Guthoff R (2002) Der modifizierte Heidelberg-Retina- Tomograph HRT. *Der Ophtalmologe* 99(4):276-280.

**Talamini et al. 2002:** Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, Negri E, Pasche C, Vaccarella S, Barzan L, Franceschi S (2002) Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control* 13(10):957-964.

**Taran Tatla et al. 2012:** Taran Tatla, Pang JY, Cernat R, Dobre G, Tadrous PJ, Bradu A, Gelikonov G, Gelikonov V, Podoleanu AG (2012) Phantom testing of a novel endoscopic OCT probe: a prelude to clinical in-vivo laryngeal use. *Proc. SPIE 8553, Optics in Health Care and Biomedical Optics V*

**Theissing 2006:** HNO-Operationslehre (2006) Theissing J ; Georg Thieme Verlag; 4.Auflage ISBN 3-13-463704-9.

**Trovato et al. 2013:** Trovato C, Sonzogni A, Ravizza D, Fiori G, Tamayo D, De Roberto G, de Leone A, De Lisi S, Crosta C (2013) Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of Barrett's oesophagus and associated neoplasia: a pilot study conducted in a single Italian centre. *Dig Liver Dis* 45(5):396-402.

**Tuchin 2007:** Tissue Optics (2007) Tuchin VV; SPIE Press; ISBN 9780819495860.

**Volgger et al. 2013:** Volgger V, Stepp H, Ihrler S, Kraft M, Leunig A, Patel PM, Susarla M, Jackson K, Betz CS (2013) Evaluation of optical coherence tomography to discriminate lesions of the upper aerodigestive tract. *Head Neck* 35(11):1558-1566.

**Volgger et al. 2015:** Volgger V, Girschick S, Ihrler S, Englhard AS, Stepp H, Betz CS (2015 Nov 28) Evaluation of confocal laser endomicroscopy as an aid to differentiate primary flat lesions of the larynx: A prospective clinical study. *Head and Neck* .doi: 10.1002/hed.24303

**Volgger et al. 2016:** Volgger V, Arens C, Kraft M, Englhard A S, Betz C S (2016) Optische Kohärenztomographie zur Früherkennung epithelialer Dysplasien und mikroinvasiver Karzinome im oberen Luft-Speise-Weg. *HNO* 64:34-40.

**Warnakulasuriya 2001:** Warnakulasuriya S (2001) Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol* 194(3):294-297.

**Warnakulasuriya et al. 2008:** Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. (2008) Oral

epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 37(3):127-133.

**Webb et al. 1987:** Webb R H, Hughes G W, Delori F C (1987) Confocal scanning laser ophtalmoscope. *Appl Opt* 26(8):1492-1499.

**Welge-Lüssen et al. 1996:** Welge-Lüssen A, Glanz H, Arens C, Oberholzer P, Probst R (1996) Die mehrmalige Biopsie bei der Diagnosestellung von Kehlkopfkarzinomen. *Laryngo-Rhino-Otol* 75(10):611-615.

**Welge-Lüssen et al. 1996:** Welge-Lüssen A, Glanz H, Arens C, Oberholzer P, Probst R (1996) Die mehrmalige Biopsie bei der Diagnosestellung von Kehlkopfkarzinomen. *Laryngo-Rhino-Otol* 75(10):611-615.

**Weller et al. 2010:** Weller MD, Nankivell PC, McConkey C, Paleri V, Mehanna HM (2010) The risk and interval to malignancy of patients with laryngeal dysplasia; a systematic review of case series and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 35(5):364-372.

**Wells et al. 2007:** Wells WA, Barker PE, MacAulay C, Novelli M, Levenson RM, Crawford JM (2007) Validation of novel optical imaging technologies: the pathologists' view. *J Biomed Opt* 12(5)

**Wilder-Smith et al. 2009:** Wilder-Smith P, Lee K, Guo S, Zhang J, Osann K, Chen Z, Messadi D (2009) In vivo diagnosis of oral dysplasia and malignancy using optical coherence tomography: preliminary studies in 50 patients. *Lasers Surg Med* 41(5):353-357.

**Wisweh 2010:** Wisweh H, Optische Kohärenztomographie der Stimm lippe zur Diagnostik und bildgebungsgestützten Laserchirurgie, 2010, Hannover, <http://d-nb.info/1004975864>; abgerufen: 31.03.2015, 16:00

**Wong et al. 2005:** Wong BJ, Jackson RP, Guo S, Ridgway JM, Mahmood U, Su J, Shibuya TY, Crumley RL, Gu M, Armstrong WB, Chen Z (2005) In vivo optical coherence tomography of the human larynx: normative and benign pathology in 82 patients.. *Laryngoscope* 115(11):1904-1911.

**Zhang et al. 2013:** Zhang SY, Lu ZM, Luo XN, Chen LS, Ge PJ, Song XH, Chen SH, Wu YL (2013) Retrospective analysis of prognostic factors in 205 patients with laryngeal squamous cell carcinoma who underwent surgical treatment. *PLoS ONE* 8(4):e60157.doi:10.1371/journal.pone.0060157

**Zimmermann et al. 2003:** Pharynx- und Larynx tumoren (2003) Interdisziplinäres Tumorzentrum Tübingen am Klinikum der Eberhard-Karls-Universität Zimmermann R, Budach W, Dammann F, Einsele H, Ohle C, Preßler H, Ruck P, Wehrmann M, Zenner H; Tübingen; ISSN 1438-8979. doi.org/10.4126/38M-002686355

## Anhang

### Bildbeispiele zur Pilotstudie zur Beurteilung klinisch suspekter Stimmlippenläsionen

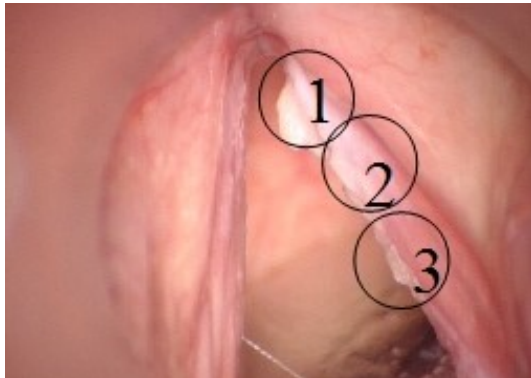


Abb.38: Patient 1

Für die Regionen 1 und 2 lag der histopathologische Befund eines Carcinoma in situ vor.

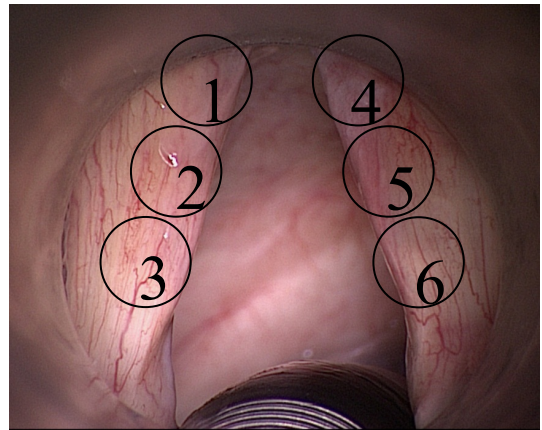


Abb.39: Patient 2

Aus den Regionen 1 und 4 wurden Proben entnommen, in 1 fand sich eine moderate Dysplasie, 4 ergab einen Normalbefund.

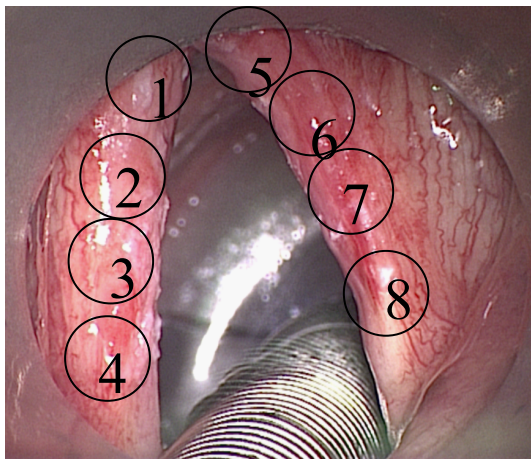


Abb.40: Patient 3

Die Regionen 2, 5 und 6 stellten sich histologisch als schwere Dysplasie dar.

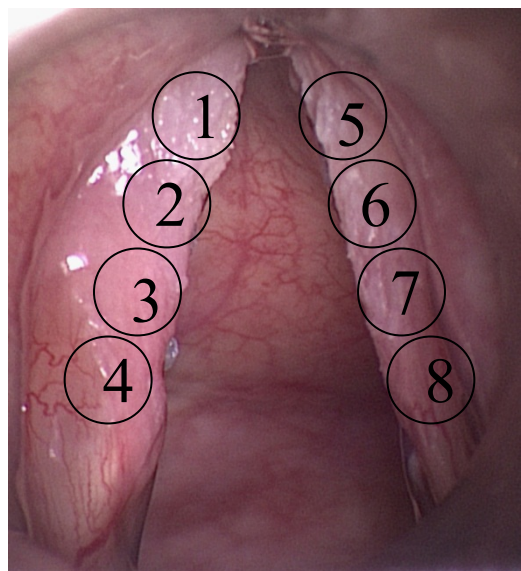


Abb.41: Patient 4

Im mit 1 und 2 markierten Bereich fand sich eine moderate Dysplasie, während die gegenüberliegenden Regionen 5 und 6 histologisch einem Carcinoma in situ entsprachen.



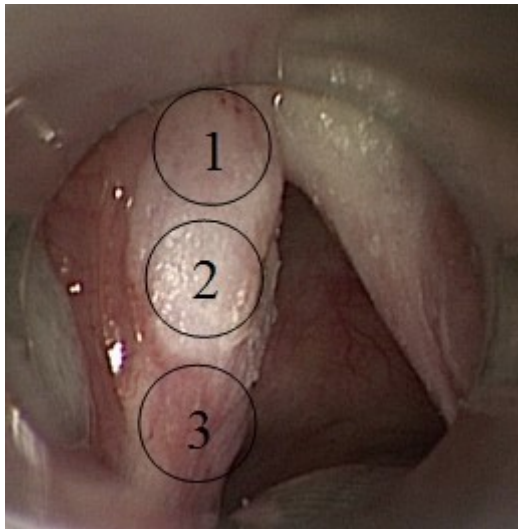


Abb.42: Patient 5

Das mit 1 bzw.2 markierte vordere bzw. hintere Drittel ergab den Befund einer hyperplastischen Laryngitis.

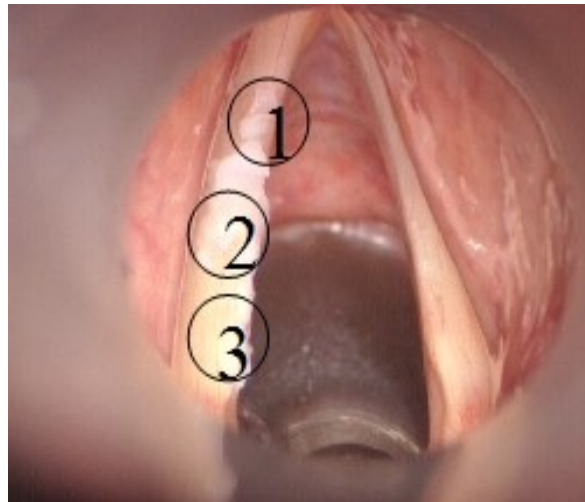


Abb.43: Patient 6

In allen drei vorgegebenen Bereichen fand sich eine geringe Dysplasie.

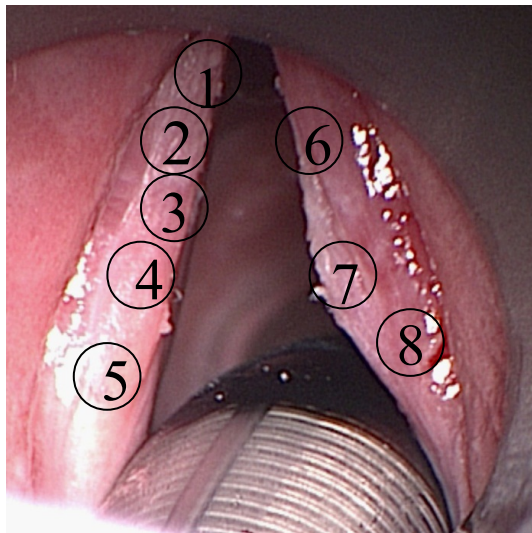


Abb.44: Patient 7

Die Regionen 1,2 und 3 stellten sich als Laryngitis dar, genauso wie gegenüberliegend die Regionen 6,7 und 8.

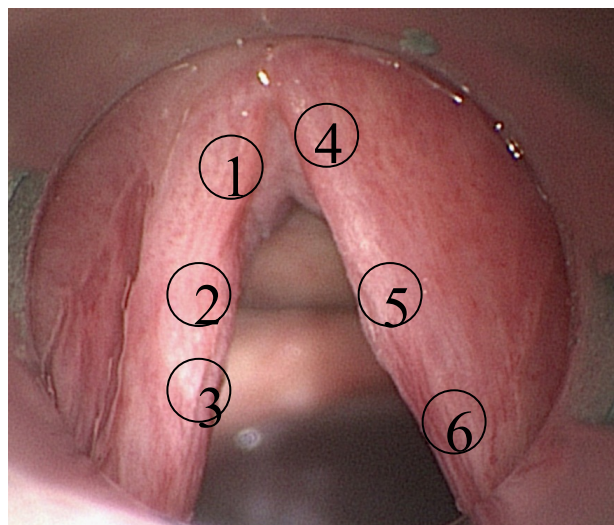


Abb.45: Patient 8

Im Bereich von 1 und 2 fand sich eine Hyperplasie, während in der Region 5 eine high-grade SIN histologisch gesichert wurde.

## **Danksagung**

---

Zunächst gilt es, meinem Doktorvater Prof.Dr. Tino Just für seine exzellente Betreuung, die oftmals kurzfristigen Rücksprachen, die stete Motivation und seinen unermüdlichen Einsatz für mich und diese Arbeit zu danken, ohne die ich diese Dissertation vermutlich nicht hätte fertigstellen können. Vielen Dank für die geopfert Zeit in den vergangenen Jahren.

Finis coronat opus!

An nächster Stelle ist meiner Familie der größte Dank auszusprechen. Für ihre Unterstützung auf meinem, teilweise etwas komplizierten, Wege zum Medizinstudium, ohne die ich meinen Wunsch zum Arztberuf wahrscheinlich nicht hätte weiterverfolgen können. Für all die Hilfe und Unterstützung in den vergangenen Jahren danke ich meinen Eltern, meinen beiden Geschwistern, Tante und Onkel, meinen Großeltern, und selbstverständlich auch dir, liebe Alexandra, für all die Jahre, die du mich bereits erträgst, und für die weiteren Jahre, die noch kommen werden.

Um der Familie treu zu bleiben: Nunc est bibendum!



## Lebenslauf

---

Benjamin Philipp von Stülpnagel

geb.am 01.09.1984 in Berlin- Wilmersdorf

### Ausbildung

---

08/1995-06/2004     **Canisius Kolleg S.J., Berlin**

Abitur

10/2009-11/2015     **Studium der Humanmedizin**

an der Medizinischen Hochschule Hannover, Georg-August-Universität  
Göttingen und der Universität Rostock

Praktisches Jahr in Hannover (Innere Medizin), St.Gallen-CH (Urologie)  
und Berlin (Chirurgie)

Physikum am 31.08.2011 mit der Note -gut-

Schriftliches Staatsexamen am 09.10.2014 mit der Note -gut-

Mündliches Staatsexamen am 24./25.11.2015 mit der Note -sehr gut-

seit 04/2016     Assistenzarzt der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie, DRK-Kliniken Berlin-Westend

### Berufsausbildung, Praktika und praktische Tätigkeiten

---

09/2004-07/2005     **Sonderpädagogisches Förderzentrum Arno Fuchs, Berlin**

Zivildienst im Bereich der Ergo- und Physiotherapie

01/2006-01/2007     **Medakademie Berlin**

Ausbildung zum Rettungsassistenten, Abschluss am 25.01.2007, Note 1,0

05/2007-07/2007     **SMH GmbH, Berlin**

Angestellter im Rettungsdienst und Krankentransport

08/2007-10/2007     **KBA e.V., Norderstedt**

Angestellter im Rettungsdienst

11/2007-11/2008     **Berliner Feuerwehr**

Praktisches Jahr als Rettungsassistent im Anerkennungsjahr, FW Suarez, Abschluss der  
Ausbildung am 11.12.2008

01/2009-09/2009     **Berliner Feuerwehr, Berlin**

Angestellter als Rettungsassistent, FW Wedding und FW Mitte

begleitend

### **Famulaturen und Praktisches Jahr**

Sophienklinik Hannover, Pflegepraktikum

HNO und Kopf- und Halschirurgie der Universität Rostock

Urologische Klinik der Universität Rostock

Plastische, Ästhetische und Handchirurgie am E.v.Behring-Krankenhaus, Berlin

Orthopädie und Chirurgie, MVZ Vitalis, Berlin

Radiologie am Kröpcke, Hannover

Tertial Innere Medizin an der Medizinischen Hochschule Hannover, Gastroenterologie und Hämatologie/Onkologie

Tertial Urologie am Kantonsspital St.Gallen, Schweiz

Tertial Chirurgie am Bethel Krankenhaus Berlin-Lichterfelde

### **Wissenschaftliche Arbeiten**

Benjamin von Stülpnagel, Robert Hagen, Bernhard Olzowy, Gabriele Witt, Hans Wilhelm Pau, and Tino Just, "Comparative Study between the Surgeon's Intraoperative Evaluation and Histopathology for Diagnosis of Laryngeal Lesions," International Scholarly Research Notices, vol. 2014, Article ID 635251, 6 pages, 2014. doi:10.1155/2014/635251

Tino Just, Ellen Guder, Gabriele Witt, Atilla Ovari, Benjamin von Stülpnagel, Eva Lankenau, Friedrich Prall, Gereon Hüttmann, Hans Wilhelm Pau, „Confocal Endomicroscopy and Optical Coherence Tomography for Differentiation Between Low-Grade and High-Grade Lesions of the Larynx“, aus: Biomedical Optics in Otorhinolaryngology, Brian J.-F.Wong (Hrsg.), Justus Ilgner (Hrsg.), Springer, ISBN 978-1-4939-1757-0 , S.479-490

Vortrag auf dem Jahreskongress der DGHNOKHC 2014 in Dortmund: „Monozentrische Studie zur Validierung der intraoperativen Einschätzung mikrolaryngoskopischer Befunde“

### **Stipendien**

Kongressstipendium und Teilnahme am Studentenforum der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie zum Jahreskongress 2013 und 2014

### **Praktika in diversen Krankenhäusern und Arztpraxen**

Bethel Krankenhaus Berlin-Lichterfelde: Rettungsstelle und Pflege

Wenckebach-Klinikum Berlin-Tempelhof: Intensivstation

Klinikum am Urban Berlin-Kreuzberg: Anästhesie

St.Joseph-Krankenhaus Berlin-Tempelhof: Gastroenterologie

Klinikum Emil von Behring Berlin-Zehlendorf: Notaufnahme

Praxis Mollenhauer/ Dr. Krakesch Berlin-Siemensstadt: Orthopädie

Notarztwagen der Berliner Feuerwehr, mit Ärzten des Westend-Krankenhauses Berlin-Charlottenburg unter Leitung von Dr.Toursarkissian

## **Selbstständigkeitserklärung**

---

Hiermit versichere ich, Benjamin von Stülpnagel, geboren am 1.9.1984 in Berlin-Wilmersdorf, dass ich die hier vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

## Thesen

---

- 1.) An Karzinomen des Larynx erkranken in Deutschland jährlich 6,9 Männer bzw, 0,9 Frauen pro 100.000 Einwohnern bei einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 62% bzw. 60%.
- 2.) Fast ausschließlich handelt es sich um Plattenepithelkarzinome. Hauptrisikofaktoren für das Entstehen von Larynxkarzinomen sind Rauchen und der übermäßige Alkoholkonsum. Auch HPV-Infektionen können das Risiko einer Erkrankung erhöhen.
- 3.) In der Tumorgenese sind verschiedene Vorläuferläsionen beschrieben, deren Früherkennung einen entscheidenden Vorteil für eine organerhaltende Therapie sowie das Gesamtüberleben bietet.
- 4.) In einer Pilotstudie wurde die Einschätzung von Stimmlippenläsionen anhand von Bildbefunden abhängig von der klinischen Erfahrung untersucht. Neben signifikanten Unterschieden aufgrund der Erfahrung zeigte sich auch in der klinisch erfahrensten Gruppe eine Vorhersagegenauigkeit von nur 65% sowie eine Sensitivität und Spezifität von 85% bzw. 56%. Die Makroskopie lässt somit nur bedingt Rückschlüsse auf die Entität des tatsächlichen Befunds zu.
- 5.) In der Diagnostik epithelialer Dysplasien der Stimmlippe werden geringe und moderate Dysplasien analog der Ljubljana-Klassifikation zu den „low-grade SIL“ gezählt, ab einer schweren Dysplasie handelt es sich um eine Risikoläsion bzw. „high-grade SIL“.
- 6.) Der diagnostische Standard ist eine mikrolaryngoskopische Untersuchung mit Probenentnahme zur histopathologischen Untersuchung. Die konfokale Endomikroskopie (CEM) und die optische Kohärenztomographie (OCT) stellen zwei nicht-invasive Verfahren zur Früherkennung epithelialer Läsionen der Stimmlippen dar, die die Risiken einer Biopsie vermeiden.
- 7.) Die Funktionsweise der CEM ist ähnlich der konventionellen Lichtmikroskopie. Durch die Verwendung eines Lasers als Lichtquelle und ein starkes Fokussieren des Lichtstrahls sind jedoch weit höhere Auflösungen und Aufnahmen verschiedener Tiefen möglich. In dieser Arbeit wurde ein HRT II mit einem Endoskop kombiniert, was eine Auflösung von 1-2  $\mu\text{m}$  ermöglichte.

- 8.) Die OCT registriert die Rückstreuintensität des in das Gewebe entsandten Lichts und generiert hieraus ein zweidimensionales Bild ähnlich der Ultraschall-Diagnostik. Der verwendete Aufbau mit einem in das OP-Mikroskop integrierten OCT-System erlaubte eine Auflösung von lateral 10,6  $\mu\text{m}$  bzw. longitudinal 12  $\mu\text{m}$  bei einer Eindringtiefe am Larynx von etwa 1,5 mm.
- 9.) Beide Verfahren wurden intraoperativ angewendet und hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Unterscheidung von high-grade SIL gegenüber low-grade SIL mit der histopathologischen Diagnose verglichen.
- 10.) Die CEM zeigte bei der Abgrenzung von low-grade SIL des Kehlkopfs von high-grade SIL eine Sensitivität von 86% bei einer Spezifität von 100%. Mit der OCT wird eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 80% erreicht.
- 11.) Um die Vorteile beider Verfahren zu kombinieren gilt es, in Zukunft ein abgestuftes Verfahren zu entwickeln, so dass die hohe Sensitivität der OCT und die Spezifität der CEM in der Früherkennung von Karzinomen des Stimmlippenepithels vereint werden können. Auch die polarisations-sensitive OCT kann als Weiterentwicklung zusätzliche Informationen liefern, um eine rechtzeitige Identifizierung von Risikoepithel zu ermöglichen.